

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Житомирський агротехнічний фаховий коледж
Державний біотехнологічний університет

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
щодо проведення практичних занять
з навчальної дисципліни

«ЗАХИСТ ТА КАРАНТИН РОСЛИН»

для підготовки фахівців ОПС «Молодший бакалавр»
зі спеціальності 201 «Агрономія»
галузі знань 20 «Аграрні науки і продовольство»



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЖИТОМИРСЬКИЙ АГРОТЕХНІЧНИЙ ФАХОВИЙ КОЛЕДЖ
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
щодо проведення практичних занять
з навчальної дисципліни
«ЗАХИСТ ТА КАРАНТИН РОСЛИН»
для підготовки фахівців ОПС «Молодший бакалавр»
зі спеціальності 201 «Агрономія»
галузі знань 20 «Аграрні науки і продовольство»



Укладачі: Інна ЖУРАВСЬКА, кандидат сільськогосподарських наук, викладач вищої категорії кафедри агрономії та лісового господарства Житомирського агротехнічного фахового коледжу;

Людмила НЕМЕРИЦЬКА, кандидат біологічних наук, доцент кафедри агрономії та лісового господарства Житомирського агротехнічного фахового коледжу;

Віктор МЕЛЬНИЧУК, викладач вищої категорії циклової комісії агрономічних дисциплін Житомирського агротехнічного фахового коледжу;

Сергій СТАНКЕВИЧ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент, завідувач кафедри зоології, ентомології, фітопатології, інтегрованого захисту і карантину рослин ім. Б.М. Литвинова Державного біотехнологічного університету

Рецензенти: Наталія ГРИЦЮК, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри здоров'я фітоценозів і трофології Поліського національного університету;

Тетяна АЛЕКСЄЄВИЧ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри агрономії та лісового господарства Житомирського агротехнічного фахового коледжу.

Методичні рекомендації містять практичні завдання з тем дисципліни «Захист та карантин рослин» відповідно до освітньо-професійної програми підготовки фахівців ОПС «Молодший бакалавр» спеціальності 201 «Агрономія», а саме: методи відбору проб у процесі карантинного огляду та експертизи; відбір проб садивного матеріалу; принципи та правила проведення ентомологічної експертизи; методи встановлення явної і прихованої зараженості продуктів запасу комахами і кліщами; мікологічна, бактеріологічна, вірусологічна, фітогельмінтологічна та гербологічна експертизи.

Рекомендовано кафедрою агрономії та лісового господарства
Протокол № 6 від «05» січня 2022 року

Завідувач кафедри _____ Наталія ЦУМАН

Ухвалено на засіданні методичної ради Житомирського агротехнічного фахового коледжу

Протокол № 4 від «11» січня 2022 року

Голова методичної ради _____ Інна МОЖАРІВСЬКА

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1.....	5
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2.....	9
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3.....	15
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4.....	18
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5.....	27
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6.....	34
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7.....	41
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8.....	45
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 9.....	51
КАТАЛОГ РЕСУРСІВ.....	57

ВСТУП

Метою методичних рекомендацій є формування у здобувачів вищої освіти необхідної бази знань з практичних питань щодо захисту та карантину рослин у сільськогосподарському виробництві від шкочинних організмів, а також утримання карантинних об'єктів регулювання у визначених місцях для проведення їх моніторингу або подальшого інспектування, фітосанітарної експертизи або обробки.

За результатами навчального курсу «Захист та карантин рослин» здобувачі вищої освіти повинні освоїти методи і методики визначення видового складу й обліку шкідливих організмів, що є основою досліджень фітосанітарного стану агроценозів, методології заходів захисту і карантину рослин, які важливі для оволодіння вміннями та навичками вирощування найважливіших сільськогосподарських культур.

Методичні рекомендації щодо проведення практичних занять з навчальної дисципліни «Захист та карантин рослин» мають допомогти здобувачам вищої освіти сформувати вміння щодо проведення спостереження за фенологією, поширенням і чисельністю шкідливих об'єктів та визначення їх видового складу; застосування різних методів захисту з урахуванням фітосанітарного стану поля, екологічної і виробничої ситуації; проведення ентомологічної, мікологічної, бактеріологічної, вірусологічної, фітогельмінтологічної та гербологічної експертиз; визначення оцінки ефективності заходів щодо захисту та карантину рослин.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 1
ТЕМА: МЕТОДИ ВІДБОРУ ПРОБ У ПРОЦЕСІ КАРАНТИННОГО
ОГЛЯДУ ТА ЕКСПЕРТИЗИ

Основні цілі:

- *ознайомитися з класифікацією рослинної продукції;*
- *ознайомитися з особливостями відбору проб для аналізу підкарантинних матеріалів;*
- *ознайомитись з необхідною при аналізі підкарантинних матеріалів документацією;*
- *техніка безпеки при відборі проб підкарантинних матеріалів.*

КЛАСИФІКАЦІЯ РОСЛИННОЇ ПРОДУКЦІЇ

Сільськогосподарська рослинна продукція різноманітна за своїм складом, фізичними властивостями та призначенням і класифікується на:

1. Насінневий матеріал – насіння різних рослин, призначене для висівання.
2. Зерно та зернопродукти – зерно злакових і бобових культур, насіння олійних та інших культур і продукти їх переробки (борошно, висівки, дерть, крупи, шроти та ін.), призначені для споживання чи технічної переробки.
3. Садивний матеріал – саджанці, живці, відводки, коренеплоди, бульби, цибулини, кореневища тощо, призначені для садіння, щеплення, розмноження.
4. Зрізані квіти, гілки, листя – живі частини рослин, призначені для складання букетів.
5. Свіжі фрукти й овочі – плоди плодових, ягідних, цитрусових, тропічних, горіхоплідних, овочевих, коренеплідних культур і винограду, призначені для споживання або переробки.
6. Сухофрукти і спеції – цілі або різані плоди й овочі (яблука, груші, чорнослив, курага, ізюм, фініки, інжир та ін.), спеції та прянощі (запашний перець, гвоздика, кориця, хмелі-сунелі) і лікарські рослини у висушеному стані.
7. Рослинно-волокнисті матеріали – бавовна, волокна льону, конопель, джуту та інших культур після первинної обробки стебел (куделя).

За способом транспортування чи зберігання рослинна продукція класифікується на:

1. Насипну – у разі перевезення в трюмах, танках морських суден, у залізничних вагонах, автомашинах чи зберігання в силосах, відсіках, буртах, у складах і зерносховищах.
2. Упаковану – у мішки, торбинки, ящики, пакети, зв'язки та ін.
3. Вкладену – у поштові посилки, ручну поклажу, багаж, продовольчі запаси екіпажів та пасажирів усіх видів транспорту.

ВІДБІР ПРОБ НАСІННЄВОГО МАТЕРІАЛУ, ЩО ПЕРЕВОЗИТЬСЯ
ЧИ ЗБЕРІГАЄТЬСЯ УПАКОВАНИМИ

Віїмки для об'єднаної проби відбирають від кожного трюму судна, вагона, автомашини. Кожна віїмка крупнозернистих культур повинна бути масою від 20 до 25 г, а дрібнозернистих – 10 г.

Виїмки насіння крупнонасінневих культур (кінські боби, кабачки, гарбузи, кісточка абрикоса, сливи, аличі, жолуді та ін.) відбирають конусним щупом з розшитих мішків, а середньо- і дрібнонасінневих – мішковим щупом з наступним зашиванням проколів у мішку. Залежно від величини партії кількість мішків і виїмок з них змінюється (табл. 1).

Таблиця 1

Необхідна кількість мішків і виїмок з них, що відбираються для формування проби за різної величини партії насіння

Кількість мішків у партії	Кількість мішків, з яких відбирають виїмки	Кількість виїмок з мішка та їх розміщення
До 10	З кожного	3 – зверху, зсередини і знизу мішка
Від 11 до 100	10	3 – так само
Від 101 до 1000	З кожного десятого	1 – місця виїмки по черзі замінюють (верх, середина, низ)
Понад 1000	З кожного двадцять п'ятого	1 – так само

Виїмки з мішків на транспорті (у вагонах, трюмах та ін.) відбирають з тих, які розміщені в доступних місцях без перекладання.

З партії насіння, запакованого в невеликі торбинки чи пакети масою від 1 до 3 кг, за виїмку беруть одну торбинку чи пакет, у якому переглядають увесь уміст.

З партії насіння дуже дрібнозернистих культур (квіткові), розфасованих у малі пакети масою від 5 до 10 г, огляду підлягає весь уміст пакета, а детальній експертизі – середня проба масою 1 г.

Відбір проб насіннєвого матеріалу, що перевозиться чи зберігається насипом

Проби насіння вітчизняного виробництва, що зберігається в складах насипом, відбирають згідно з ГОСТ 12036 від кожного відсіку чи бурту, розміщуючи виїмки у формі конверта (рис. А) у п'яти місцях за величини партії до 20 т або 20 м² поверхні. Якщо поверхня партії насіння за масою і площею більша, її умовно поділяють на секції приблизно 20 м² кожна і відбирають від кожної у п'яти місцях виїмки (рис. Б).

У кожному означеному місці відбирають виїмки з трьох шарів: верхнього – на глибині 10 см від поверхні насипу, середнього – на половині висоти насипу і нижнього – на відстані від 10 до 15 см від підлоги.

При цьому виїмки від кожної секції складають в окрему пробу.

Схему взяття виїмок насіння та іншої продукції під час зберігання насипом у складі наведено на рисунку 1.

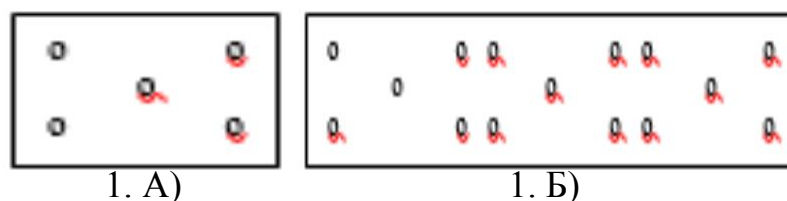


Рис. 1. Схеми взяття виїмок насіння та іншої продукції під час зберігання насипом у складі

Відбір проб зерна і зернопродуктів

Відбір проб упакованого зерна і зернопродуктів проводять згідно з описаною вище методикою (відбір проб насінневого матеріалу, що перевозиться чи зберігається насипом).

Відбір виїмок зерна, яке транспортується насипом у трюмах морських суден, проводять під час їх вивантаження зі струменем, що падає з транспортера чи зернопомпи, перетинаючи його по всій ширині спеціальним ковшем чи пробовідбірником через рівні проміжки часу.

Загальна маса об'єднаної проби (всіх виїмок) повинна становити не менше ніж 10 г на кожную тонну.

З кожного трюму формується окрема об'єднана проба.

Виїмки зерна із залізничних вагонів у разі їх повного завантаження насипом відбирають під час вивантаження спеціальним ковшем або пробовідбірником зі струменем, що падає з транспортера через рівні проміжки часу з таким розрахунком, щоб загальна маса відібраних виїмок (об'єднаної проби) становила не менше ніж 100 г на кожную тонну.

У разі неповного завантаження вагонів виїмки відбирають безпосередньо у вагонах конусним щупом з трьох шарів у кожному місці: з верхнього – на глибині 10 см, середнього – на половині висоти насипу і нижнього – на відстані від 10 до 15 см від підлоги вагона.

Кількість і місця взяття виїмок визначають залежно від місткості вагона:

- у 16–20-тонних вагонах – у п'яти місцях (рис. 2.А);
- у 33–40-тонних вагонах – у восьми місцях (рис. 2. Б);
- у 60-тонних вагонах – в одинадцяти місцях (рис. 2. В).

З кожної автомашини вантажністю до 20 т виїмки об'єднують в одну пробу. Схеми взяття виїмок зерна під час перевезення насипом у вагонах наведено на рисунку 2.



2. А)

2. Б)

Рис. 2. Схеми взяття виїмок зерна під час перевезення насипом у вагона

Виїмки зерна із силосів відбирають під час його перекачування зі струменя, що падає, перетинаючи його по всій ширині спеціальним ковшем чи пробовідбірником через рівні проміжки часу. Загальна маса об'єднаної проби (всіх виїмок) повинна становити не менше ніж 10 г на кожную тонну.

З кожного трюму формується окрема об'єднана проба, а в складах – аналогічно відбору виїмок насіння згідно з описаною вище методикою (відбір проб насінневого матеріалу, що перевозиться чи зберігається насипом).

У разі надходження або зберігання кукурудзи в качанах виїмки відбирають по секціях площею 20 м² у п'яти місцях (рис. 1. А) з трьох шарів – з верхнього, середнього і нижнього або під час розвантаження вагонів – через рівні

проміжки часу. Одна проба в кількості не менше ніж 30 качанів складається з виїмок від кожних 15 т.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Яка існує класифікація рослинної продукції?
2. Як проводять відбір проб насіннєвого матеріалу, що перевозиться чи зберігається упакованим?
3. За якою методикою проводять відбір проб насіннєвого матеріалу, що перевозиться чи зберігається насипом?
4. Як відбирають проби зерна і зернопродуктів?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 2

ТЕМА: ВІДБІР ПРОБ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ

Основні цілі:

- *ознайомитися з особливостями відбору проб для аналізу підкарантинних матеріалів;*
- *ознайомитись з необхідною при аналізі підкарантинних матеріалів документацією;*
- *техніка безпеки при відборі проб підкарантинних матеріалів.*

Від садивного матеріалу плодових, ягідних, квітково-декоративних та інших деревних і чагарникових культур (живці, відводки, саджанці тощо), який поступає зв'язаний у пучки або упакований у ящики, огляду підлягає така кількість одиниць:

- до 100 шт. – весь садивний матеріал;
- від 101 до 500 – кожен другий екземпляр;
- від 501 до 3000 – кожен десятий;
- від 3001 до 10000 – кожен п'ятдесятий;
- понад 10000 – партію поділяють порівну і беруть для огляду екземпляри за наведеною вище схемою, як від окремих партій.

У пробу для детальної експертизи відбираються в першу чергу підозрілі на зараження карантинними об'єктами екземпляри, але не менше ніж один екземпляр на 100 одиниць.

Кількість мішків (ящиків), з яких повинні відбиратися виїмки, залежить від величини партії і становить:

- до 10 – з кожного пакування;
- від 11 до 100 – з кожного п'ятого, але не менше ніж з десяти;
- від 101 до 500 – з кожного двадцятого;
- від 500 до 1000 – з кожного тридцятого;
- понад 1000 – партію поділяють і відбирають виїмки окремо за наведеною вище схемою в окремі проби.

Від мішків (ящиків), що перевозяться у вагонах, автофургонах тощо, допускається відбирання виїмок від пакувань, розміщених у доступних місцях.

Від партій садивних бульб (коренеплодів) під час транспортування або зберігання насипом беруть виїмки бульб і ґрунту. Виїмки бульб (коренеплодів) у кількості від 8 до 10 шт. кожна беруть у п'яти місцях поверхні насипу до 20 м² за формою конверта (рис. 1.2, А) зверху і на глибині 40 см. Якщо поверхня насипу більша, то її умовно ділять на секції до 20 м². Усі виїмки з кожної секції окремо складають в одну об'єднану пробу. Під час навантажування чи вивантажування бульб (коренеплодів) виїмки від 8 до 10 бульб (коренеплодів) кожна відбирають через рівні проміжки часу з розрахунку, щоб від кожних 10 т було взято 200 бульб (коренеплодів), які становлять окрему об'єднану пробу. У разі перевезення бульб (коренеплодів) у мішках, сітках, корзинах чи іншій тарі виїмки беруть по всій глибині від 5 % усіх місць (з п'яти мішків із 100). Виїмки ґрунту з бульб (коренеплодів) відбирають у п'яти місцях з підлоги транспортного засобу після його вивантаження. Виїмки ґрунту з упакованих

бульб (коренеплодів) беруть з тих самих місць, з яких відбирають бульби (коренеплоди), попередньо струшуючи їх на підлогу чи підстилку. Виїмки ґрунту з бульб (коренеплодів) у сховищах беруть з поверхні насипу в тих самих місцях, де відбирають бульби (коренеплоди). Загальна маса виїмок ґрунту в пробі повинна бути не менша ніж 300 см³ (г), а середньої проби від них – 100 см³ (г).

Відбір проб зрізаних квітів

Відбір проб зрізаних квітів, гілок і листя, призначених для складання букетів та упакованих у ящики, проводять залежно від кількості пакувань і вкладень у них за табл. 2. Виїмки беруть з різної глибини ящика. У невеликих букетах або партіях до 100 шт. огляду підлягає кожен екземпляр.

Таблиця 2

Кількість квітів (гілок, листків), що відбирають у виїмку залежно від величини партії

Кількість ящиків у партії	Кількість ящиків, з яких беруть виїмки	Кількість квітів, що відбирають у виїмку
До 10	З кожного	Кожна сота, але не менше ніж 10
Від 11 до 50	10	Те саме
Від 51 до 100	З кожного п'ятого	1 із 100
Від 101 до 500	З кожного десятого	Те саме
Понад 500	З кожного двадцять п'ятого	Те саме

Відбір проб свіжих фруктів та овочів

Виїмки свіжих плодів плодових, цитрусових, тропічних, овочевих, ягідних та інших культур залежно від кількості місць у партії відбирають з такої кількості пакувань (ящиків):

- до 20 – з кожного;
- від 21 до 100 – з кожного п'ятого, але не менше ніж з двадцяти;
- від 101 до 500 – з кожного двадцятого, але не менше ніж з двадцяти;
- від 501 до 1000 – з кожного п'ятдесятого;
- понад 1000 – з кожного сотого.

За одну виїмку відбирають від 3 до 5 крупних плодів (ананаси, грейпфрути, банани, кокосові горіхи), від 8 до 10 середніх (яблука, груші, апельсини, лимони, ківі), або від 200 до 300 г дрібних (ягоди, вишні, черешні, волоські горіхи і фундук та ін.). З партії фруктів і овочів більшої ніж 5 т виїмки з кожних 3 т об'єднують в одну пробу. Виїмки картоплі та інших коренеплодів харчового (кормового) призначення або для технічної переробки відбирають таким самим чином, як і від садивного матеріалу відповідно до методики відбору проб садивного матеріалу.

Відбір проб сухофруктів і спецій

Виїмки сухофруктів (яблука і груші різані, курага, урюк, ізюм, інжир, фініки та ін.), спецій і прянощів та сухих лікарських рослин відбирають вручну, за можливості з усієї глибини пакування, у кількості від 100 до 200 г з кожного мішка (ящика), який підлягає огляду.

Кількість місць, що підлягають огляду і відбору виїмок, така сама, як і для свіжих плодів згідно з методикою відбору проб свіжих фруктів та овочів.

Під час розфасування сухофруктів і прянощів у малі пакети (до 500 г) з кожного мішка чи ящика, що підлягають огляду, їх відбирають 5 % (5 із 100).

Відбір проб рослинно-волокнистих матеріалів

Проби рослинно-волокнистих матеріалів, упакованих у мішки, тюки чи інші засоби, залежно від кількості місць у партії, беруть з однієї виїмки від кожного пакування, що підлягає огляду:

- до 100 місць – з десяти;
- від 101 до 500 – з кожного десятого;
- від 501 до 1000 – з кожного двадцять п'ятого;
- понад 1000 – з кожного п'ятдесятого.

Виїмки відбирають вручну якомога глибше з пакування масою від 200 до 300 г кожна.

Складання об'єднаної проби

Кожну виїмку партії рослинної продукції відбирають в окремий мішечок, пакет, банку і безпосередньо під час взяття оцінюють на однорідність матеріалу.

У разі однорідності підкарантинного матеріалу виїмки по черзі висипають на чисту гладеньку поверхню (брезент, клейонку, плівку, папір, фанеру та ін.), переглядають і вибирають у пробірки або целофанові (плівкові) мішечки виявлених шкідників (живих і мертвих), насіння бур'янів, уражені хворобами чи пошкоджені шкідниками зернини, плоди, живці та ін. Потім усі виїмки об'єднують в одну пробу, з якої виділяють дві рівноцінні за розмірами середні проби, з яких одна підлягає експертному аналізу на ПКР, а друга – контрольна, для арбітражної експертизи в карантинній лабораторії.

До проби додають заповнену етикетку (рис. 3.) та відібрані в пробірки чи мішечки під час огляду виїмок шкідники, насіння бур'янів, хворі та пошкоджені зернини, плоди, рослини та інше для карантинної експертизи в лабораторії.

Етикетка до проби, відібраної для карантинної експертизи

1. Країна походження рослинного матеріалу, дата надходження на пункт

_____ (зазначити назву)

2. Маса партії _____

3. Кількість місць у партії _____

4. Сільськогосподарська продукція _____

5. Пункт та організація призначення _____

6. Маса (чиста) проби _____

7. Дата і місце відбору проби _____

8. Пробу для експертизи відібрав _____
(посада, прізвище, ім'я, по батькові)

9. Додаткові відомості _____

« _____ » _____ р. Підпис _____

Рис. 3. Етикетка до проби, відібраної для карантинної експертизи

Виділення середніх проб

Із об'єднаної проби виділяють дві середні проби в розмірах, зазначених для кожного виду продукції. Середні проби сипких матеріалів (зерно, зернопродукти, ґрунт та ін.) виділяють із об'єднаної проби згідно з ГОСТ 12036, висипавши її на стіл і рівномірно розгорнувши у формі квадрата. За допомогою двох спеціальних дерев'яних планок зі скошеним ребром матеріал перемішують, захоплюючи його двох боків і одночасно зсипаючи на середину. Після декількох перемішувань утворений валик захоплюють планками з протилежних кінців і зсипають матеріал до середини. Пробу перемішують тричі, після чого знову вирівнюють у формі квадрата і за допомогою планок по діагоналях ділять на чотири трикутники. Два протилежні трикутники зерна чи іншого матеріалу вилучають, а ті, що залишилися, збирають до купи вирівнюють і знову ділять на чотири трикутники, з яких два підуть для наступного поділу, а два вилучають.

Поділ ведуть доти, доки не буде отримано два трикутники матеріалу масою, необхідною для середньої проби кожен. Один з них становитиме середню пробу для експертного аналізу в лабораторії ППКР, а другий – контрольну середню пробу для можливої арбітражної експертизи в зональній карантинній лабораторії.

Середні проби плодів, овочів, садивного матеріалу і зрізаних квітів складають з підозрілих на ураження хворобами та пошкоджених шкідниками екземплярів. При цьому розмір середньої проби не повинен бути меншим від зазначеного. У середні проби картоплі, цибулин, коренеплодів включають і ґрунт, що обсипався з них під час виділення середньої проби, який аналізують разом із спеціально відібраною пробою ґрунту згідно з методикою відбору проб садивного матеріалу. Залишки об'єднаної проби після виділення середньої проби повертають у партію рослинної продукції, звідки вона була взята. Карантинну експертизу однієї середньої проби проводять державні інспектори безпосередньо на ПКР у пункті первинного огляду продукції. Контрольну пробу в щільно упакованій тарі у випадку виявлення зараження підкарантинними об'єктами разом із зразком-документом і етикеткою направляють у відповідну зональну карантинну лабораторію для арбітражної експертизи.

У разі виявлення зараженості вантажу (підкарантинного матеріалу) живими карантинними чи іншими шкідливими об'єктами згідно із законом України про карантин рослин (статті 7, 11, 13) та Статусом державної служби з карантину рослин України (розділ III, пп. 10–12 та розділ VII, пп. 25–32) здійснюється затримка вантажу на час, необхідний для проведення знезараження доступними засобами чи оформлення повернення вантажу відправникові, про що негайно повідомляється в обласну та Головну карантинну служби

Результати експертизи в місці її проведення оформляються відповідним протоколом і складається акт фітосанітарного контролю матеріалів (рис. 4).

Форма протоколу експертизи

Штамп місця прибуття
й експертизи (ПКР)

ПРОТОКОЛ ЕКСПЕРТИЗИ № _____
підкарантинного матеріалу від « _____ » _____ р.

№ супровідного документа	Дата надходження	Назва матеріалу, кількість проб	Походження і звідки прибув матеріал	Пункт призначення

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРТИЗИ

Виявлено об'єкти:

1. Ентомологічні _____
2. Фітопатологічні _____
3. Бактеріологічні _____
4. Гельмінтологічні _____
5. Ботанічні _____
6. Вірусні _____

Дата і пункт відправлення матеріалу після експертизи _____

Зав. лабораторії _____ (Особистий підпис) _____ (Розшифрування підпису)

Експерти _____ (Особистий підпис) _____ (Розшифрування підпису)

Форма акта фітосанітарного контролю матеріалів, транспортних засобів та відбору проб для карантинної експертизи

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я І РАЦІОНАЛЬНОГО ВИКОРИСТАННЯ ЛІСЬКИХ ЗЕМЕЛЬ

Державна інспекція з карантину рослин _____ області

АКТ № _____
фітосанітарного контролю матеріалів, транспортних засобів та відбору проб для карантинної експертизи від _____ р.

Мною, державним інспектором з карантину рослин на підставі Закону України «Про карантин рослин» проведено огляд підкарантинного матеріалу і транспортних засобів та відбір проб для карантинної експертизи.

Назва продукції _____
За товаротранспортною накладною _____ (вказати номер, дату)

Маса партії _____
Кількість місць _____
Країна походження _____
Карантинний довід на ввезення або транзит № _____ від _____
Фітосанітарний сертифікат № _____ від _____
випущений на адресу _____
Місце зберігання _____

Для карантинної експертизи відібрано такі проби:
у кількості _____ шт., масою _____ кг.
У пробах, тарі, транспорті, продуктах харчування виключно карантинні та інші інші шкідливі організми _____

Встановлено такі заходи _____

Термін проведення заходів _____

Акт складено в присутності власника (представника) підкарантинного матеріалу (транспортної організації) _____

Державний інспектор _____ Представник _____

Рис. 4. Бланки протоколу і акту фітосанітарного контролю матеріалів

Виявлені в процесі огляду проб та експертизи середньої проби шкідники, зерна бур'янів, уражені хворобами або пошкоджені рослинні органи чи цілі рослини, виготовлені з них мікропрепарати та інше, залиті консервувальними рідинами чи оброблені в інший спосіб, мітять і зберігають як зразок-документ.

Середня проба, у разі виявлення зараженості її карантинними об'єктами, знищується, а контрольна середня проба разом з етикеткою і зразком-документом доставляється в ЗКЛ (зональну карантинну лабораторію) для арбітражного підтвердження фахівцями карантинного зараження матеріалів.

Середні проби від партій насіння, зерна і продуктів його переробки, інших сипких рослинних матеріалів (сухофрукти, лікарські, спеції, рослинно-волокнисті та ін.), у яких були виявлені карантинні об'єкти, знезаражують і знищують. Зразки-документи карантинних об'єктів у законсервованому нежиттєздатному стані зберігають як колекційний матеріал.

Середні проби від партій насіння, продовольчої та зернофуражної продукції, яких карантинних об'єктів не виявлено, повертають у партію рослинної продукції, звідки вони були взяті. Середні проби від продукції, яка швидко псується (плоди, ягоди, овочі, картопля та ін.) і зберіганню не підлягає, у разі виявлення в них карантинних об'єктів знищуються, а зразки-документи від них зберігаються в законсервованому стані як колекційний матеріал.

Середні проби від партій садивного матеріалу і зрізаних квітів у разі виявлення карантинних об'єктів знищуються, а в разі не виявлення карантинних об'єктів – повертаються в партію вантажу, а в сумнівних випадках – передаються в карантинні розсадники для вирощування і нагляду (спостережень) протягом трьох років. Зразки-документи повинні зберігатись в окремих добре вентильованих кімнатах у спеціальних шафах для колекцій.

Вимоги безпеки

Роботи з відбору виїмок, складання проб, виділення середньої проби, огляду та експертизи підкарантинних матеріалів повинні виконуватись з використанням спецодягу, засобів індивідуального захисту і дотриманням усіх вимог «Інструкції з техніки безпеки під час огляду підкарантинних рослинних вантажоматеріалів».

Контрольні питання для самоперевірки

1. Як відбирають проби зерна і зернопродуктів, садивного матеріалу, зрізаних квітів, свіжих фруктів та овочів?
2. Як відбирають проби сухофруктів і спецій та рослинно-волокнистих матеріалів?
3. За якою методикою проводять складання об'єднаної проби та виділення середніх проб?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 3

ТЕМА: ПРИНЦИПИ ТА ПРАВИЛА ПРОВЕДЕННЯ ЕНТОМОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Основні цілі:

- ознайомитись, яка мета ентомологічної експертизи;
- ознайомитись з основними принципами ентомологічної експертизи;
- ознайомитись з методами встановлення явної і прихованої зараженості продуктів.

МЕТА ЕНТОМОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Ентомологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших шкідливих комах і кліщів в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, ґрунт, продукти та організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України. Включає й акарологічну експертизу, тобто виявлення зараженості кліщами.

Будь-який матеріал, що надходить в лабораторію на фітосанітарну експертизу, у першу чергу підлягає ентомологічній експертизі. Це зумовлено тим, що в ньому можуть виявитись живі шкідники в активному стані.

Мета ентомологічної експертизи – виявити зараженість зразків карантинними чи іншими небезпечними шкідниками. З впевненістю не можна діагностувати зараженість матеріалу за пошкодженнями, тому слід намагатися знайти самого шкідника.

ПРИНЦИПИ ЕНТОМОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ:

- ознайомлення з документацією походження рослинного матеріалу з метою визначення ймовірного його зараження карантинними шкідниками;
- встановлення ознак зараження певними стадіями шкідника рослинної продукції;
- врахування пори року та кліматичних особливостей країни-імпортера, походження рослинного вантажу з метою визначення можливої стадії розвитку в період його надходження;
- огляд підкарантинних рослинних матеріалів та пакувального матеріалу і тари.

Експертиза повинна проводитись таким чином, щоб не допустити пропусків неперевіреного матеріалу та виключити випадкове зараження чи забруднення зразків.

Вкрай неможливим при цьому є плутанина з етикетками або змішування насіння, живців чи інших матеріалів із різних зразків. Наприклад, насінину, яка випадково випала із пакета на підлогу не можна класти назад у пакет, якщо немає повної впевненості, що вона видана з цього зразка. Її слід розрізати, перевірити, чи вона не заражена всередині шкідником і знищити.

ПРАВИЛА ПРОВЕДЕННЯ ЕНТОМОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ:

1. Не залишати без огляду розпаковані рослини та висипані для експертизи насінини.
2. Почату експертизу кожного зразка слід закінчувати до перерви в роботі.

3. Не відкривати одразу декілька посилок чи зразків, які надійшли одночасно.

4. Всі матеріали зберігати у спеціально відведеному місці, а ящики із живими рослинами – у прохолодному місці, підтримуючи вологість пакувального матеріалу.

Усі виявлені в процесі ентомологічного, фітопатологічного та інших видів аналізів карантинні і не карантинні організми одразу вміщують в окремі пробірки, відповідно фіксують, укладають усередину кожної пробірки етикетку, написану тушшю на тонкому пергаментному папері.

Якщо зібраний матеріал вдалося визначити одразу, то його наукову назву (видову та родову) записують на такій же другій етикетці і вкладають у ту ж саму пробірку.

У разі встановлення лише роду, до якого належить організм, пишуть назву роду і після нього ставлять «sp» (вид не визначено).

У випадках, коли види шкідників, збудників хвороб чи бур'янів неможливо визначити точніше, ніж до роду, в протоколі експертизи вказують, що виявлені організми належать до некарантинного виду.

На кожний шкідливий організм складають одразу картку.

Виявлених під час експертизи карантинних шкідливих організмів та інших видів комах, паразитичних нематод, мікропрепарати збудників грибних і бактеріальних хвороб рослин, насіння та плоди бур'янів, а також частини рослин, пошкоджених шкідниками, з ознаками хвороб та вражених нематодами, зберігають у лабораторії чи на пункті у зафіксованому вигляді, як зразки-документи, що підтверджують звітні дані. На увесь цей матеріал пишуть етикетки, він систематизується.

Слід наголосити, що навіть досвідчений систематик не зможе зробити висновок щодо організму, який неправильно зафіксований.

Дорослих комах заморюють ефіром або дихлоретаном.

Далі висипають па листок паперу і розкладають за рядами та родинами. Особин, яких треба визначати більш детально, вміщують у скляні пробірки з етикеткою, її вкладають таким чином, щоб можна було прочитати не виймаючи. Бажано також у цю пробірку вкласти зразок пошкоджень, відділивши його від комах ватним тампоном. Пробірку закривають ватним тампоном.

Труднощі для експерта виникають у випадках, коли таких ніжних комах, як галиці та щитівки пересилають прямо у клеєвих пастках. Основою ентомологічних клеїв є поліізобутилен, який розм'якшує хітиновий покрив комах.

Після цього дістати об'єкт із пастки, не пошкодивши його, практично неможливо. Тому слід дотримуватися правил фіксації та пересилки карантинних об'єктів.

Зразки кори з колоніями щитівок та листки з колоніями личинок білокрилок розкладають на шари ваги товщиною 0,5–1,0 см.

Вату з комахами вміщують у складений вдвоє листок білого паперу, на внутрішній стороні якого записують відомості про місце та час збору рослин-господарів.

Галиць, дорослих білокрилок, трипсів зберігають у 96 %-ному спирті. Краще використовувати рідину Коніке (п'ять частин гліцерину, дві частини льодяної оцтової кислоти і три частини води).

Гусениць, личинок та лялечок жуків перед фіксацією вміщують на 2–3 хв у крутий кип'яток або обварюють. Це необхідно для того, щоб личинки не потемніли надалі при фіксації. На короткий час зберігати личинок і гусениць можна, фіксуючи їх після обварювання, у розчині кухонної солі. Для більш надійної фіксації використовують 70 %-ний спирт.

Уражені грибними хворобами частини рослини гербаризують. Зразок повинен складатися не менше, ніж з 10 екземплярів вражених рослин.

На нього пишуть етикетку, вказуючи культуру, сорт, місце збору, дату і ким зібраний. Зразок обгортають декількома шарами паперу і направляють у лабораторію. Забороняється їх пересилати в поліетиленових пакетах.

У соковитих плодів, ягід вражені ділянки з обов'язковим захватом здорових тканин вирізають та висушують між листками паперу. Плоди, їх частини, бульби, коробочки можна також фіксувати в 70 %-ному спирті або в 4–5 %-ному водному розчині формаліну з додаванням кристаликів мідного купоросу.

Заражені плоди кісточкових культур фіксують спочатку протягом трьох–чотирьох годин у розчині мідного купоросу (4 г на 1 л дистильованої води), а потім витягують, промивають водою і вміщують у 40 %-ний розчин формаліну (з розрахунку 25 мл на 1 л дистильованої води) протягом трьох–чотирьох днів.

Живці для аналізу зрізають з чотирьох сторін дерева довжиною 20–25 см. Верхні та нижні зрізи парафінують, на кожному коробку підписують етикетку.

Свіжі плоди завертають у пергаментний папір і, підписавши, направляють в лабораторію.

Будь-який матеріал, що надходить в карантинну лабораторію на експертизу, ще до реєстрації повинен перевірятися ентомологом. Усі матеріали рослинного і тваринного походження реєструються у журналі.

На кожному посилку, бандероль, зразок складають протокол експертизи.

Після ентомологічного аналізу весь матеріал разом з протоколом передають спеціалістам – фітопатологу, бактеріологу, фітогельмінтологу, гербологу.

Заповнені протоколи з результатами усіх видів аналізів передаються завідувачу карантинної лабораторії, який робить висновок про такі заходи:

- направити матеріал на знезараження;
- дозволити його видачу отримувачу з умовою висівання чи висаджування;
- випустити для використання за призначенням без карантинних обмежень.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Які є принципи ентомологічної експертизи?
2. Які правила ентомологічної експертизи Ви знаєте?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 4

ТЕМА: МЕТОДИ ВСТАНОВЛЕННЯ ЯВНОЇ І ПРИХОВАНОЇ ЗАРАЖЕНОСТІ ПРОДУКТІВ ЗАПАСУ КОМАХАМИ І КЛІЩАМИ

Основні цілі:

- ознайомитись з методами встановлення явної і прихованої зараженості продуктів.

Методи встановлення явної і прихованої зараженості продуктів запасу комахами і кліщами розподіляються на:

а) *Візуальний* – виявлення явної зараженості продуктів запасу зовнішнім оглядом виїмок при відбиранні і середньої проби в лабораторії та огляду сходу і проходу з сит після просіювання середньої проби з використанням лупи чи мікроскопу.

б) *Фототермоелектричний* або Берлезе-Туллгрена – виявлення явної зараженості продуктів запасу рухомими фазами комах і кліщів на основі негативної їх реакції фото- і термотаксису, освітленням і прогріванням середньої проби продуктів запасу в спеціальному пристрої.

в) *Флотаційний* – виявлення явної і прихованої зараженості продуктів запасу зануренням середньої проби зерна в розчини солей і аналіз комах, зерен тощо, що випливали на поверхню.

г) *Рентгенографічний* – встановлення прихованої зараженості насіння, зерна та інших продуктів рентгенівськими знімками.

д) *Мікролюмінесцентний* – виявлення явної і прихованої зараженості насіння і зерна зернових і бобових культур за люмінесценцією яєць зернівок і «пробочок» довгоносиків на зернах під час опромінення їх ультрафіолетовим світлом ртутно-кварцових ламп.

е) *Забарвлення «пробочок»* – виявлення прихованої зараженості насіння і зерна зернових і бобових культур довгоносиками і зернівками забарвленням «пробочок» на поверхні зерен розчинами перманганату калію.

ж) *Біологічний* – дорошування виявлених у преімагінальних (яйце, личинка, лялечка) фазах розвитку комах до стадії імаго з наступною ідентифікацією.

з) *Інкубації (контрольний)* – витримання середньої проби продуктів запасу в термостатах за температури від 25 до 30°C протягом 45 діб для встановлення можливої зараженості.

Підготовка проб

Ентомологічній експертизі піддається середня проба, виділена з об'єднаної проби підкарантинного матеріалу, відібраної відповідно до методик.

ППКР середня проба аналізується зразу ж після виділення чи доставляється в карантинну лабораторію в щільній упаковці, яка не допускає розповзання із неї комах і кліщів, не пізніше, як через три доби від моменту взяття. До аналізу середня проба повинна зберігатися в холодильнику чи прохолодному приміщенні не довше трьох діб.

Безпосередньо перед експертизою для активізації комах та кліщів і полегшення їх виявлення середню пробу витримують протягом 10–20 хв у термостаті чи приміщенні за температури від 20 до 25 °С.

Візуальний метод

Апаратура та матеріали: ваги лабораторні загального призначення згідно з ГОСТ 24104 4-го класу точності з найбільшою межею зважування 2 кг; комплект лабораторних сит з круглими отворами діаметром 1,0; 1,5 і 2,5 мм та решітного полотна (№ 56) з розміром отворів 0,56 мм та діаметром обруча 30 см; пристрій механізований для просіювання зерна та насіння; дошка для аналізу чи лотки, кювети, ексаустер (рис. 5); лупи настільні і налобні зі збільшенням не менше ніж у чотири рази, згідно з ГОСТ 25706; бінокулярний мікроскоп; термометр згідно з ГОСТ 13646 з похибкою вимірювання ± 1 °С; пробірки згідно з ГОСТ 1770; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; шпатель; совочок; пінцети; скальпель; голки препарувальні; щіточка; папір білий не глянцева (ворсистий, фільтрувальний); скло розмірами 20 × 30 см; шафа сушильна.

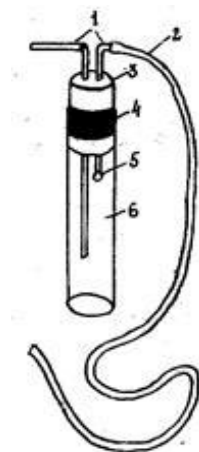


Рис. 5. Ексаустер: 1 – скляні трубки; 2 – гумова трубка; 3 – гумова пробка; 4 – кільце із лейкопластиру або ізоляційної стрічки для кріплення краю циліндра; 5 – ковпачок із шовкової чи капронової сітки; 6 – скляний циліндр

Підготовлену до експертного аналізу середню пробу висипають на дошку для аналізу або лоток і ретельно переглядають. Виявлених при загальному огляді комах вибирають пінцетом у пробірки, а зерна чи шматочки інших продуктів з ознаками пошкодження – в окрему тару і щільно закупорюють.

Після загального огляду середню пробу висипають в комплект сит і просівають вручну протягом 1–2 хв при 120 кругових рухах за хвилину або в механізованому пристрої згідно з інструкцією до нього.

Після просіювання сід з кожного сита окремо висипають на аналізну дошку, розрівнюють тонким шаром і розбирають шпателем, оглядаючи через лупу. Виявлених комах у будь-якій фазі розвитку вибирають у пробірки, а зерна чи інші продукти з явними ознаками пошкодження – в окрему тару і закупорюють. Прохід із сит при невеликій кількості висипають в чашки Петрі і переглядають через лупу або під бінокулярним мікроскопом.

Прохід із сит від борошна, висівок та інших дрібних продуктів при великій кількості аналізують в 5-ти наважках по 20 г кожна. Для цього наважки висипають на білий не глянцеви́й папір (фільтрувальний), вирівнюють шаром висотою близько 0,5 см і злегка придавлюють склом для одержання рівної поверхні. Через 5 хв після зняття скла оглядають поверхню проходу із сит і за наявності зду́тин, слідів руху шкідників виявляють їх і вибирають. Після цього прохід підкарантинних продуктів обережно зсипають в кювет чи лоток, а комах, кліщів і їх личинок, що залишилися на папері, вибирають у пробірки ексгаустером, змоченими у воді щіточкою чи препарувальною голкою.

Відібрані зерна, крупинки, шматочки іншої продукції з ознаками пошкодження розрізають скальпелем і розтини оглядають через лупу.

Виявлених у них личинок, лялечок чи імаго комах виймають препарувальною голкою в пробірки для ідентифікації. Для полегшення розрізання зерен чи насінин попередньо їх можна замочити у воді на декілька годин. Усіх виявлених і зібраних у пробірки комах із середньої проби, а також доставлених із середньою пробою раніше зібраних комах із виїмок підраховують, окремо живих і мертвих, ідентифікують за визначниками до виду, умертвляють, забезпечують етикеткою і зберігають в пробірках чи ентомологічних коробках як зразок-документ. Якщо неможливо визначити видову належність преімагінальних фаз комах, які знаходяться в живому стані, то подальшу їх ідентифікацію проводять біологічним методом, який описано нижче. У разі виявлення в середній пробі карантинних та інших видів комах у протоколі експертизи, який оформлюють як окремий документ чи журнальний запис і зберігають в ПКР чи лабораторії. Вказують їхню кількість за видами, стадіями розвитку і станом (живі чи мертві). Інші розділи протоколу експертизи заповнюють відповідні експерти після проведення ними фітопатологічної, гельмінтологічної, гербологічної експертиз. На основі протоколу оформлюють свідоцтво карантинної експертизи (рис. 6), яке видається власнику продуктів запасу із зазначенням видового складу, кількості і стану виявлених шкідників чи інших об'єктів та рекомендують заходи для знезараження партії матеріалу.

с. відомство карантинної експертизи

СВІДОЦТВО КАРАНТИННОЇ ЕКСПЕРТИЗИ № _____ від _____ р. Назва карантинної лабораторії
Видано _____ На супровідний лист № _____ від _____ р. Назва рослинного матеріалу та кількість зразків _____
Положення _____ Від кого надійшов матеріал _____ Пункт призначення _____
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРТИЗИ _____
Рекомендовані заходи _____
Додаткові відомості _____
МП Зав. лабораторією _____ Особистий підпис, розшифрування підпису _____ « _____ » _____ р.

Рис. 6. Бланк свідоцтва карантинної експертизи

Метод фототермоеклекції або Берлезе-Туллгрена

Апаратура та матеріали: фототермоеклектор (пристрій Берлезе-Туллгрена) (рис. 7) з набором сит діаметром від 20 до 25 см, висотою обруча

(обідка) не менше 4 см і розміром круглих вічок від 0,2 до 3,0 мм; комплект лабораторних сит з круглими отворами діаметром 1,0, 1,5 і 2,5 мм та плетеного сита з розміром квадратних отворів 0,5 мм; лампа електрична потужністю 40 Вт; лупи налобні і складні зі збільшенням не менше ніж у чотири рази згідно з ГОСТ 25706; бінокулярний мікроскоп; пробірки згідно з ГОСТ 1770; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; шпатель; пінцети; лійка; фільтри з паперу згідно з ГОСТ 12026; склянки; спирт етиловий технічний згідно з ГОСТ 17299; шафа сушильна.

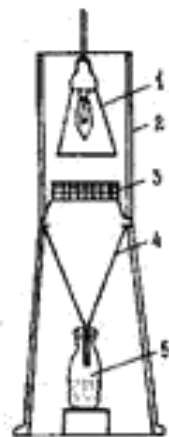


Рис. 7. Схематичне зображення фототермоелектратора Тулгрена:
1 – електролампа з рефлектором; 2 – жерстяний циліндр; 3 – проба на ситі;
4 – лійка; 5 – посудина з фіксуючою рідиною

Підготовлену до експертного аналізу середню пробу оглядають і просіюють через комплект сит, згідно з методикою, описаною для візуального метода.

У посудину комахозбірника приладу наливають етиловий спирт технічний, розбавлений водою до концентрації не меншої ніж 40 %. Схід із сит, починаючи з верхнього, висипають рівним шаром висотою не більше ніж 3 см на сітку сита фототермоелектратора з розміром чарунок залежно від розміру часток підкарантинного матеріалу, від 0,2 до 3,0 мм, а зверху насипають прохід середньої проби. Над пробою в пристрій на висоті 40 см встановлюють електролампу потужністю 40 Вт і вмикають в електромережу. Залежно від виду підкарантинного продукту і товщини шару середньої проби, її прогрівають до 2 год. Рухомі шкідники, які залишилися у пробі після огляду, подразнені теплом і світлом електролампи спускаються донизу, провалюються крізь сито і по лійці скочуються в посудину зі спиртом. Комах і кліщів, які потрапили в посудину зі спиртом, відфільтровують крізь паперовий фільтр і визначають видову належність під бінокулярним або, у разі неможливості самостійної ідентифікації, вибирають у пробірки, забезпечують етикеткою, щільно закупорюють і направляють на визначення до карантинної лабораторії. Після експертизи кожної середньої проби набори сит і пристрій фототермоелектратора знезаражують промиванням киплячою водою або прогрівають в сушильній шафі за температури не менше ніж 80 °С протягом 10 хвилин.

Флотаційний метод базується на здатності комах і заражених зерен (насіння) при зануренні у розчини солей спливати, у той час коли незаражені зерна (насінини) тонуть.

Апаратура, матеріали та реактиви: стакани хімічні згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; шпателі; пінцети; скальпель; ситечко з металевою чи капроною сіткою; папір фільтрувальний згідно з ГОСТ 12026.; термометр згідно з ГОСТ 13646; натрій хлористий згідно з ГОСТ 13830; натрій азотнокислий згідно з ГОСТ 4168 або калій азотнокислий згідно з ГОСТ 4144; лупи згідно з ГОСТ 26706; бінокулярний мікроскоп.

Від підготовленої до експертного аналізу і переглянутої середньої проби зерна (насіння) зернових або бобових культур відбирають підряд без вибору 300 цілих зерен. Відібрані зерна залежно від їх величини висипають в один із розчинів солей: дрібнонасінневі культури (просо, сорго, сочевиця тощо) – у 30 %-ний розчин хлористого натрію (кухонної солі); середньонасінневі культури (пшениця, ячмінь, жито, горох, нут, чина, квасоля та ін.) – у 50 %-ний розчин азотнокислого натрію або калію (селітри); крупнонасінневі культури (кукурудза, крупна квасоля, кормові боби, арахіс і т. п.) – у насичений розчин азотнокислого натрію чи калію (селітри). Температура всіх розчинів солей повинна бути в межах від 15 до 20 °С. Висипані розчини солей зерна після збовтування осідають на дно або випливають на поверхню. Всі зерна, які випливали нагору, вибирають ситечком чи пінцетом і розкладають на фільтрувальний папір для просихання.

Після просихання зерен їх оглядають під бінокулярним мікроскопом, розтинають скальпелем, препарувальними голками виймають виявлених усередині живих чи мертвих комах і за визначниками встановлюють їх вид.

У разі виявлення преімагінальних фаз розвитку комах (личинки, лялечки) в живому стані і неможливості повної їх ідентифікації подальше визначення провадять відповідно до біологічного методу, який описано нижче.

Результати експертизи і виявлення карантинних та інших видів комах реєструють аналогічно попереднім методом.

Рентгенографічний метод

Апаратура, матеріали та реактиви: рентгенівський апарат типу РЕИС-И-45, «Електроника-25» з м'яко-променевою трубкою типу БС-1 або Марс-1; проекційна установка, негатоскоп або флюороскоп; лупи згідно з ГОСТ 25706 чи бінокулярний мікроскоп; фотоплівка рентгенівська згідно з ГОСТ 24876; фотопапір згідно з ГОСТ 10752; фотореактиви; годинник, секундомір чи таймер; бачки, кювети фотографічні; клейкий прозорий папір чи плівка скотч; калька; металеві цифри; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; коробки об'єктні чи касети для досліджуваного матеріалу; пінцети, шпателі, скальпель, голка препарувальна; спирт етиловий ректифікат чи технічний згідно з ГОСТ 17299; олівці прості; дошка для аналізу чи лотки; решітка (сітка) із дроту з розміром отворів 30 мм і площею за розмірами плівки.

Від підготовленої до експертного аналізу і візуально проаналізованої середньої проби як при візуальному методі без вибору відбирають 300 цілих зернин. Відібрані зерна в один шар рядками розкладають на клейку поверхню скотчу, липкого паперу чи закріпленої прижимною рамкою або решіткою в

коробці чи касеті кальку. В одному із кутків коробки чи касети кладуть металеву непроникну для рентгенівських променів цифру, яка буде помітна на плівці після її експонування та фотообробки і слугуватиме для ідентифікації кадрів плівки. Підготовлені коробку чи касету обережно, щоб не змістилися зерна, ставлять на предметний столик апарата. Залежно від конструкції апарата і розміщення променевої трубки зверху чи знизу предметного столика, під коробку чи над нею підкладають незасвічену плівку чи фотопапір у світлонепроникних касетах-конвертах або закріплюють плівкопротяжний механізм з фоточутливим матеріалом у телескопічній захисній камері згідно з інструкцією до апарата.

На пульті управління променевою трубкою установлюють показники режиму експонування (сила струму – від 15 до 30 мкА, напруга – від 10 до 50 кВ, експозиція – від 5 до 30 хв), які залежать від стану матеріалу (розміри зерен, вид, вологість тощо) та чутливості фотоматеріалу і вмикають електротаймер апарата.

З кожного досліджуваного зразка роблять три зйомки з різним режимом експонування, що дає змогу отримати чітке зображення зерен з різними фазами розвитку шкідливих комах. Експоновані об'єктні коробки чи касети із зернами обережно, щоб не змістилися зерна, переносять на інший стіл у лабораторію, а відзняту плівку чи фотопапір проявляють і фіксують у фотолабораторії відповідно до вимог виготовлювача фотоматеріалів. Отримані рентгенограми промивають і висушують. Просушені рентгенограми досліджують на негато- чи флюороскопі, проекційній установці чи за допомогою лупи, біноклярного мікроскопа. При огляді підраховують заражені зерна, відмічаючи їх зображення на рентгенограмі простим олівцем. Зерна на негативі рентгенограми мають білий або сірий вигляд, виїдені в них шкідниками порожнини – темні, а наявні в порожнинах личинки, лялечки чи імаго комах – більш світлі.

У разі неможливості визначення виду виявлених живих шкідників, їх збирають у пробірки за преімагінальними (яйця, личинки, лялечки) фазами розвитку, забезпечують етикеткою, щільно закупорюють і разом із залишками середньої проби піддають ідентифікації біологічним методом або методом інкубації. Зерна на негативі рентгенограми мають білий або сірий вигляд, виїдені в них шкідниками порожнини – темні, а наявні в порожнинах личинки, лялечки чи імаго комах – більш світлі.

У разі необхідності перевірки зараженості зерна і стану комах у них (живі чи мертві), відповідно відміченим на рентгенограмі, пошкоджені зерна знімають пінцетом з об'єктної коробки чи касети, розтинають під біноклярним мікроскопом скальпелем і оглядають наявних у них шкідників, визначаючи живі вони чи мертві та ідентифікують за видами. Для полегшення розрізання зерна попередньо можна замочити у воді до набухання.

Мікролюмінесцентний метод – базується на властивості яєць комах і «пробочок» довгоносиків на зерні яскраво світитися в ультрафіолетових променях.

Апаратура та матеріали: освітлювач люмінесцентний з набором світлофільтрів чи діагностичний ультрафіолетовий опромінювач КД-33 чи аналітична ртутно-кварцова лампа із світлофільтром, що пропускає

ультрафіолетові промені; куляри захисні з жовтим склом марки ЖС-4 для захисту очей експерта від ультрафіолетового випромінювання; біноклярний мікроскоп чи лупи згідно з ГОСТ 25706; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; пінцети, скальпелі.

У затемненій лабораторії, одягнувши захисні окуляри і виконуючи всі заходи перестороги від надлишкового ультрафіолетового опромінення, вмикають діагностичні освітлювачі чи лампи і в їх променях оглядають зерна в чашках Петрі через лупи чи під біноклярним мікроскопом. Зерна з наявними «пробочками» або відкладеними на них яйцями, які яскраво світяться у фільтрованих ультрафіолетових променях, відбирають пінцетом у чисті чашки Петрі чи пробірки. Відібрані заражені (з «пробочками») зерна (насіння) під бінокляром розтинають скальпелем і визначають наявність в них живих чи мертвих шкідників та ідентифікують їх. Для полегшення розрізання зерна чи насіння можна попередньо замочити у воді до набухання.

Метод забарвлення «пробочок»

Апаратура, матеріали та реактиви: секундомір; колба мірна згідно з ГОСТ 1770; чашки згідно з ГОСТ 9147; склянки згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; ситечко з металевої чи капронової сітки (плетеного решітного полотна); скальпель, пінцети; термометр згідно з ГОСТ 13646 з похибкою вимірювання + 1 °С; папір фільтрувальний згідно з ГОСТ 12026; перманганат калію згідно з ГОСТ 5777; лупа зі збільшенням не менше ніж у чотири рази згідно з ГОСТ 25706 чи біноклярний мікроскоп.

Від підготовленої до експертного аналізу і візуально згідно з візуальним методом перевіреної середньої проби підряд, без вибору відраховують не менше ніж 300 цілих зернин (насінин) і висипають у ситечко.

У чашку наливають теплу, близько 30 °С воду, всипають кристалики перманганату калію і розмішують до утворення насиченого кольору.

Ситечко із зерном занурюють на 1 хвилину у розчин, де воно починає набухати, збільшуючи розмір наявних «пробочок» – входів шкідників і забарвлюється в коричневий колір. Після цього ситечко із зерном промивають у холодній воді, занурюючи його на 20–30 секунд, де зерно набуває нормального забарвлення, а «пробочки» залишаються темними.

Відібрані зерна з «пробочками» підраховують, розрізають скальпелем і визначають наявних за фазами розвитку (личинки, лялечки, імаго) живих і мертвих шкідників. У разі неможливості ідентифікувати виявлених живих преімагінальних фаз шкідників, їх збирають у пробірки, забезпечують етикеткою, щільно закупорюють і витримують до появи імаго згідно з біологічним методом визначення.

Біологічний метод – метод є допоміжним і призначений для виявлення зараження продуктів запасу комахами у преімагінальних фазах розвитку (яйця, личинки, лялечки) у разі неможливості ідентифікувати їх іншими методами.

Апаратура та матеріали: садки лабораторні ентомологічні скляні (банки місткістю 0,25; 0,5 чи 1 дм³); сітка шовкова або капронова з розміром вічок 0,2 або бязева тканина; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; термостат, терморегульовані камери чи лабораторні шафи, які забезпечують підтримку температури в межах від 20 до 30 °С; лупи із

збільшенням не менше ніж у чотири рази згідно з ГОСТ 25706 чи бінокулярний мікроскоп; пінцети, голки препарувальні; спирт етиловий ректифікований технічний згідно з ГОСТ 17299; папір фільтрувальний згідно з ГОСТ 12026; ефір медичний для наркозу, хлороформ чи чотирихлористий вуглець.

Всі зерна (насіння) або шматочки інших продуктів, на яких були виявлені «пробочки», яйця шкідників при візуальному чи інших вище наведених методах експертизи, а також живі личинки і лялечки, відібрані в пробірки переносять у простерилізовані (протерті спиртом) з вистеленим фільтрувальним папером дном скляні садки (банки). Сюди ж в якості корму додають від 40 до 50 г підкарантинного продукту з тієї середньої проби, в якій вони були виявлені.

Садки з підкарантинними об'єктами накривають сіткою чи бяззю, закріплюють щільно резиновим кільцем так, щоб шкідники не змогли вилізти і встановлюють у термостат чи лабораторні шафи, де утримують їх за температури від 20 до 25 °С до повного виходу імаго наявних шкідників.

Періодично, через кожні 10 діб до появи перших дорослих особин шкідників, а потім через три-п'ять діб, садки оглядають, виявлених імаго шкідників вибирають у пробірки, заморюють ефіром, хлороформом чи чотирихлористим вуглецем, щільно закривають, забезпечують етикеткою і зберігають до визначення і підрахунку за видами, а після визначення – як зразок-документ чи в колекціях.

Метод інкубації (контрольний). Суть методу полягає у витримуванні проб підкарантинного матеріалу в умовах, сприятливих для розвитку живих шкідників, що знаходяться на різних стадіях. Метод призначений для контролю великотоннажних партій зерна (насіння) чи інших продуктів запасу і виявлення можливої зараженості.

Апаратура та матеріали: комплект лабораторних сит із плетеного решітного полотна з круглими вічками діаметром 1,0; 1,5 і 2,5 мм, діаметром обруча 30 см та плетеного сита з квадратними отворами розмірами 0,5 × 0,5 мм; термостат, терморегульовані камери чи лабораторні шафи, які забезпечують підтримання температури в межах від 20 до 30 °С; скляні садки (банки) для утримання середніх проб з щільними кришками, перфорованими отворами діаметром 0,2 мм для газообміну із середовищем; сітка шовкова чи капронова з розміром вічок 0,2 мм або бязь; чашки Петрі згідно з ГОСТ 25336; пробірки згідно з ГОСТ 1770; пінцети, препарувальні голки; лупи згідно з ГОСТ 25706 чи бінокулярний мікроскоп; спирт етиловий ректифікований технічний згідно з ГОСТ 17299; ефір медичний для наркозу, хлороформ або чотирихлористий вуглець; папір фільтрувальний згідно з ГОСТ 1202.

Середню пробу після візуального аналізу, згідно з візуальним методом, об'єднавши схід і прохід із сит, розкладають в чисті простерилізовані спиртом скляні садки (банки) з вистеленим фільтрувальним папером дном. Банки накривають сіткою чи бяззю, закріплюють резиновим кільцем так, щоб шкідники не змогли вилізти, чи щільно закривають перфорованою кришкою і встановлюють у термостат чи лабораторні шафи, де утримують за температури від 25 до 30 °С протягом 45 днів. Через кожні 15 діб садки виймають, старанно переглядають, вибирають і підраховують виявлених шкідників за фазами

розвитку, розміщують їх у пробірки, щільно закривають, забезпечують етикеткою і ведуть визначення. Садки повертають у термостат або лабораторну шафу до наступного визначення можливої зараженості. У разі неможливості визначення видової належності виявлених преімагінальних фаз шкідників їх у живому стані повертають в садки для дорощування до імаго. Визначених шкідників заморюють ефіром чи іншою речовиною і в закупорених пробірках з етикетками зберігають як зразок-документ у колекціях.

Заходи за результатами експертизи. На підставі результатів карантинної експертизи, отриманих будь-яким із вищевикладених методів і оформленого свідоцтва карантинної експертизи відповідно до Закону України про карантин рослин (статті 7, 11, 13) та Статутом карантинної служби України (розділи III пп. 10–12 та VII пп. 25–32) уповноважені на те обласна чи Головна державна карантинна служба приймають рішення щодо заражених карантинними шкідниками партій продуктів запасу, про проведення їх знезаражувальної обробки чи способів переробки, знищення чи негайного повернення відправникові, не допускаючи на територію України. Рішення державних органів карантину рослин України на її території обов'язкові для негайного виконання всіма організаціями, установами, господарствами та іншими суб'єктами господарчої чи підприємницької діяльності.

Вимоги безпеки. Під час проведення аналізів середніх проб продуктів запасу повинні використовуватися спецодяг, засоби індивідуального захисту. Необхідно дотримуватися правил безпеки роботи з тими чи іншими матеріалами, хімічними реактивами та обладнанням. Електрообладнання (холодильники, термостати, сушильні шафи тощо) повинно бути заземлено і роботи з ним виконуватися відповідно до чинних інструкцій з техніки безпеки.

Роботи з рентгендіатостики повинні виконуватись особами, які пройшли спеціальне навчання і мають допуск відповідних органів санітарного контролю.

Роботи з хімічними (розчини солей, фотореактиви тощо) і особливо леткими наркотичними речовинами (ефір медичний, хлороформ та ін.) проводяться у витяжній шафі чи в добре вентиляваному приміщенні відповідно до чинних інструкцій з техніки безпеки під час роботи з ними.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Які існують методи встановлення явної і прихованої зараженості продуктів запасу комахами і кліщами?
2. У чому полягає візуальний метод?
3. Опишіть метод фототермоелектричної або Берлезе-Туллгрена.
4. На чому базується флотацийний метод?
5. У чому суть рентгенографічного методу?
6. Що Ви знаєте про мікролюмінесцентний метод?
7. Опишіть метод забарвлення «пробочок».
8. Для чого використовують метод інкубації?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 5

ТЕМА: МІКОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА

Основні цілі:

- знати, що таке мікологічна експертиза;
- знати, яка основна мета карантинної мікологічної експертизи рослинних матеріалів;
- ознайомитись з основними методами мікологічної експертизи.

МЕТА МІКОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Мікологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших збудників грибних захворювань в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, ґрунт, продукти та інші організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України.

Основна мета карантинної мікологічної експертизи рослинних матеріалів – виявлення хвороб рослин, збудників яких занесено до «Переліку шкідників, хвороб рослин та бур'янів, які мають карантинне значення в Україні», а також й інших видів, що можуть завдати значної шкоди сільському господарству у разі занесення на територію країни. Тому під час мікологічної експертизи визначають усі шкідливі організми (гриби, бактерії, віруси) для вчасного здійснення відповідних заходів. На мікологічну експертизу середні проби надходять після ентомологічної експертизи і в окремії упаковці залишки сходів із сит у разі просіювання, чи спливів у разі флотації від попередньої експертизи.

До підкарантинних матеріалів належать:

- насіння сільськогосподарських, лісових, декоративних, квіткових і дикорослих культур;
- зерно та зернопродукти (рис – обрушений і необрушений, крупи, борошно і вироби з нього, горіхи, арахіс, кава-зерно, какао-боби, кондитерські вироби, солод, шрот, комбікорми, макуха тощо);
- рослини та їх частки (зріз живих квітів, горшечні рослини, живці, цибулини, бульби, кореневища, коренеплоди, корені, щепи тощо);
- копра, топіока, тютюн;
- волокно бавовни, льону та інших прядивно-волокнистих культур, вовни немитої та нечесаної, шкірсировини, що не пройшла хімічне оброблення;
- лікарська рослинна сировина;
- культури живих грибів, бактерій, вірусів, нематод, кліщів, які є збудниками і носіями хвороб рослин;
- висушені овочі, фрукти, гриби, чаї, прянощі;
- колекції хвороб рослин, насіння і гербарії;
- рослинні вклади у поштові відправлення, багаж пасажирів;
- деревина та хімічно не оброблені вироби з неї, пиломатеріали
- моноліти і зразки ґрунтів;
- фураж (сіно, комбікорм, підстилка тощо), використовуваний під час ввезення худоби з-за кордону;
- свіжі овочі, фрукти, картопля, баштанні, гриби.

До підконтрольних об'єктів належать:

- транспортні засоби з інших країн або з підкарантинної зони;
- сільськогосподарські та лісові угіддя, які межують із державним кордоном України і прикордонним пунктом ввезення (трикілометрова зона);
- приміщення, де складують імпортовані підконтрольні і підкарантинні матеріали.

Підконтрольні матеріали:

- тара, контейнери, промислові товари, вироби зі шкіри, вовни, деревини, гофрокартону, пакувальний матеріал, вироби з рослинних матеріалів, які можуть бути носіями карантинних і небезпечних шкідників, хвороб рослин і бур'янів, продукти рослинного походження, які пройшли технічне перероблення (в оригінальній упаковці), а також цукор, багаж, поштові відправлення;
- сільськогосподарські знаряддя.

Прилади та обладнання

Для експертизи необхідно мати таке обладнання: ваги лабораторні згідно з ГОСТ 24104, мікроскопи біологічні: МБІ та МБР, стереоскопічний та імерсійний, біноклярні мікроскопи МБС-9, МБС-10, біноклярну БЛ-1 або наlobну лупу, люмінесцентний мікроскоп, камеру Горяєва, автоклав вертикальний або горизонтальний, центрифугу ЦВР-1, термостат для пророщування насіння, лупи згідно з ГОСТ 25706, пробірки скляні згідно з ГОСТ 1770, чашки Петрі і Коха, склянки згідно з ГОСТ 25336, колби згідно з ГОСТ 1770, гумовий товчач, кристалізатор, електропаяльник, фарфорову ступку згідно з ГОСТ 9147, ростильні фаянсові та пластмасові, пінцети, голкотримач, освітлювач УФ, спиртівку, скальпель медичний очний, голки препарувальні, баню водяну, електроплитку згідно з ГОСТ 14919, скельця предметні згідно з ГОСТ 25336, скельця покривні, совки лабораторні, лінійки для ділення аналізованого зразка, папір фільтрувальний згідно з ГОСТ 12026, мікрометри окулярні, агар, спирт етиловий ректифікат згідно з ГОСТ 18300, воду дистильовану, дошку аналізу, лотки, кювети (поемальовані чи пластмасові), мікротом санний, гербарій, таблиці, визначники, колекції хвороб рослин, насіння і плодів, фотоапарат.

МЕТОДИ МІКОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

При мікологічній експертизі найчастіше використовують наступні методи: макроскопічний (зовнішній огляд) з мікроскопіюванням, центрифугування, біологічний метод, люмінесцентний, серологічний та ін.

Макроскопічний метод використовують для візуального виявлення захворювань. У випадку зовнішнього огляду рослинної продукції, середньої проби, продуктів перероблення виробів із рослин, а також сажкових утворень, спор, склероціїв у насінні за явними ознаками. Експертиза кожного рослинного матеріалу розпочинається із зовнішнього огляду. При цьому використовують лупу, бінокляр, мікроскоп.

Підготовлену до експертного аналізування середню пробу і рослинні виділення попередньої експертизи висипають тонким шаром на аркуш білого паперу зігнутого з чотирьох сторін, скло, плівку, поемальовані чи пластмасові кювети і ретельно оглядають за допомогою лупи з невеликим полем зору. Щоб уникнути додаткової зараженості насіння спорами грибів кювети після кожного зразка дезінфікують 96 % спиртом. Після експертизи на столі збирають рослинні рештки та інше сміття і спалюють, а стіл та лабораторні інструменти дезінфікують після експертизи кожного зразка.

Щуплі деформовані зразки з підозрою на внутрішню інфекцію, що не проявляють зовнішніх ознак, відбирають і досліджують біологічним методом, а саме: закладаючи у вологу камеру для отримання спороношення. Якщо утворюється тільки міцелій, без спороношення, то його пересівають на поживне середовище з метою отримати чисту культуру й ідентифікувати виявлений гриб.

В окремих випадках при зовнішньому огляді можна відразу за плямистостями, виразками, розривами ідентифікувати види захворювань, наприклад: іржу, сажку та ряд інших. Надмірне розростання тканин, патологічні зміни у різних частинах рослин (бульбах, цибулинах, насінні та ін.), на яких відсутнє спороношення грибів досліджують біологічним методом.

Метод центрифугування використовують у разі необхідності встановити зараження поверхні насіння спорами грибів, наприклад, сажкою, іржею та іншими. Метод дозволяє відокремити поверхнево розміщені спори грибів, а також вилучити зооспорангії у стані спокою збудника раку картоплі на бульбах із використанням спеціальних речовин та ідентифікування їх під мікроскопом.

Для аналізування із різних місць вихідного, середнього, документ зразків відбирають від 5 до 25 г – 200 шт. насінин із різними ознаками ураженості. Відібране насіння висипають у колбу, крупне насіння (кукурудза, квасоля тощо) розсипають у дві колби, заливають водою в кожену колбу по 20 мл (1 центрифугова пробірка), струшують. Насіння з гладкою поверхнею (пшениця, кукурудза) струшують 5 хв; насіння з шорсткою поверхнею (буряк) – 10 хв; насіння льону – 1 хв. Після струшування воду виливають у пробірки і центрифугують від 1 до 5 хв при 600 обертах на хвилину.

Надосад зливають, а з осаду з однієї пробірки виготовляють п'ять препаратів й ідентифікують виявлені гриби. Препарати оглядають під мікроскопом (збільшення $\times 10-40$).

Біологічний метод застосовують для виявлення у рослинному матеріалі грибної, частіше – внутрішньої інфекції. У цьому разі створюють оптимальні умови для росту, розвитку та спороношення грибів.

Метод вологих камер оснований на стимулюванні розвитку і росту мікроорганізмів в ураженому насінні, плодах, листках, стеблах, кореневищах тощо. Із середнього зразка насіння відбирають чотири проби по 50 або 100 насінин (залежно від досліджуваної культури). Для пророщування насіння у вологій камері застосовують сухі стерильні мікробіологічні чашки Петрі чи Коха, пластмасові або фаянсові ростильні, марлю, фільтрувальний папір, вату. На дно чашок вміщують кружечки з марлі в три шари, або кладуть

фільтрувальний папір у два шари на гігроскопічну вату товщиною не більшою за 0,25 см. Для пророщування насіння квасолі, гороху та інших крупнонасінних культур застосовують чашки Коха, пластмасові або фаянсові ростильні, дно яких заповнюють кварцевим свіжо-прокаленим піском. Для виявлення внутрішньої інфекції перед закладанням у вологу камеру, насіння попередньо дезінфікують 5 хв в 0,5%-вому розчині марганцевокислого калію або 2 хв у 96%-вому етиловому спирті та промивають стерильною або свіжопрокип'яченою охолодженою водою. Після чого насіння просушують між листками стерильного фільтрувального паперу. Марлю, скомбінований субстрат чи фільтрувальний папір у чашках Петрі зволожують до певної вологості дистиллятом, стерильною або свіжопрокип'яченою водою (воду кип'ятити 30 хв).

У ростильні, заповнені кварцевим свіжопрокаленим піском, зволженим стерильною водою, розкладають насіння, злегка вдавлюючи його в пісок, на відстані 1,5–2,0 см одне від одного. Закриті мікробіологічні чашки Петрі або Коха, ростильні із закладеним насінням уміщують у стерильний термостат для пророщування за температури 27–30 °С. Оглядають насіння зернових, льону через 3–4 дні інкубування; насіння інших культур оглядають в строки згідно з ГОСТ 12044. У разі потреби швидкої експертизи, насіння розрізають навпіл стерильним скальпелем і розрізаною поверхнею кладуть на поживне середовище в чашки Петрі, які вміщують у термостат з температурою 22–26 °С. На 3–5-й день після утворення колоній міцелію і початку спороношення гриба ідентифікують збудника хвороби під мікроскопом.

Із поверхні плодів гриби виділяють, розміщуючи уражені плоди в стерильні чашки Коха вистелені зволженим фільтрувальним папером і витримують у термостаті за температури 25–27 °С до появи ознак спороношення (3–4 дні).

Із поверхні листків гриби виділяють розміщуючи уражені листки в стерильні чашки Коха вистелені зволженим фільтрувальним папером і витримують у термостаті за температури 25–27 °С до появи ознак спороношення (3–4 дні). Під час експертизи внутрішньої частини листка на виявлення збудника хвороби, листок, який має різні плями, промивають спиртом 2–3 секунди, а потім висушують фільтрувальним папером, фломбують і поміщають у чашки Петрі.

Виокремлюють гриб із поверхні стебла трав'янистої рослини зі шматочків довжиною 2–3 см, які без попереднього дезінфікування вміщують у вологі камери (або на поживні середовища) і витримують у термостаті за температури 25–27 °С до появи ознак спороношення (3–4 дні). Під час виокремлювання гриба із внутрішньої тканини стебла, його розрізають на шматочки, які дезінфікують методом фломбування. Після цього стерильним скальпелем їх розрізають уздовж і вміщують у вологу камеру розрізом догори (або на поживне середовище) розрізом донизу) і витримують у термостаті за температури 25–27 °С до появи ознак спороношення (3–4 дні). Ідентифікують збудник захворювання після появи спороношення гриба, оглядаючи спори під стереоскопічним чи імерсійним мікроскопом. Саджанці, живці, чубуки оглядають за допомогою лупи на наявність ознак захворювання (плями,

виразки, напливи, ракові утворення тощо). Якщо неможливо ідентифікувати збудника захворювання візуально за зовнішніми симптомами, часточки ураженого матеріалу вміщують у вологі камери або на поживне середовище і після появи спороношення встановлюють видову належність, оглядаючи спори під стереоскопічним чи імерсійним мікроскопом.

Висівання на поживне середовище. Якщо поживне середовище в чашках Петрі засмічене іншими мікроорганізмами, гриб відділяють від них методом розливання і тільки після цього для отримання чистої культури пересівають на поживне середовище у пробірку. Метод розливання полягає у тому, що стерильною голкою беруть з чашки Петрі частини міцелію зі спорами гриба і переносять у пробірку з розплавленим поживним середовищем, температура якого не перевищує 50 °С.

Пробірку закривають корком, обертають її між долонями, щоб частинки міцелію та спори розійшлися на поживному середовищі. Потім його виливають у стерильну чашку Петрі. Коли з'являються окремі колонії гриба, їх пересівають у пробірки на поживне середовище. Найкращим середовищем для початкових пересівів грибів є 1 %-ний картопляно-глюкозний агар.

Стерилізація поживних середовищ та посуду

Існує кілька способів стерилізації: високою температурою, текучою парою, парою під тиском та сухим жаром.

Поживні середовища для культивування грибів стерилізують текучою парою або під тиском. Стерилізація текучою парою здійснюється в апараті Коха чи автоклаві одну годину три дні підряд. Стерилізацію парою під тиском застосовують за необхідності температури понад 100 °С і проводять в автоклаві під тиском від 1 до 1,5 атм.

Чашки Петрі та інший лабораторний посуд стерилізують сухим жаром у сушильній шафі за температури 120–130 °С дві години. Перед стерилізацією кожен чашку загортають у папір. При завантаженні між посудом та стінками сушильної шафи залишають проміжки, щоб температура скрізь була однаковою. Виймають простерилізований посуд після того, як сушильна шафа охолоне.

Пінцети, скальпелі, ножиці та інші інструменти для знезараження проводять декілька разів через полум'я спиртівки, попередньо занурюючи їх у спирт.

Голки, петлі для пересівання стерилізують, також обпалюючи у полум'ї спиртівки, але попередньо у спирт не занурюють. Спочатку прогрівають металеву частину голкотримача, провівши її горизонтально в полум'ї пальника, після цього голку чи петлю тримають вертикально над полум'ям, доки дріт не досягне червоного розжарювання тричі.

Зберігати чисті предметні скельця рекомендують у закритому ексікаторі, покривні скельця – у 96 % спирті в маленькому скляному боксі, або ретельно витерті в коробочках.

Поживні середовища для грибів

Для виділення грибів з рослинного матеріалу та їх культивування використовують різноманітні тверді поживні середовища рослинного і синтетичного походження. Тверді середовища отримують, додаючи до них агар або желатин.

Тверді поживні середовища: Картопляний агар, Картопляно-глюкозний агар, Суслівий агар, Картопляний желатин, Середовище Чапека, Модифіковане середовище Леоніана, Стерилізована картопля, Стебла буркуну.

Виготовлення мікроскопічних препаратів

Тимчасові препарати. Інфекцію зі зразка вміщують у краплю води, нанесену на чисте предметне скло, і обережно накривають покривним скельцем. Вода при цьому не повинна виходити за краї покривного скла, а її залишок збирають фільтрувальним папером.

Постійні мікропрепарати готують наступним чином. Для цього на сухе предметне скло наносять невеликий шматочок твердого гліцерин-желатину обережно підігривають його над полум'ям спиртівки. Коли він стане рідким, в нього кладуть досліджуваний матеріал і накривають покривним склом. Постійний препарат також можна зробити з тимчасового.

Для кращого зберігання постійні мікропрепарати окантовують з боків покривного скла спеціальним або безбарвним лаком. На склі мікропрепарату роблять постійний напис тушшю, або приклеюють етикетку.

Люмінесцентний метод полягає у тому, що рослинні тканини у синьо-фіолетових чи ультрафіолетових променях починають яскраво люмінесцювати.

Майже всі рослинні тканини під час обстеження у цих променях мають первинну люмінесценцію, що відрізняється у здорових та заражених грибом тканинах однієї рослини кольором свічення. Для детального мікроскопічного дослідження матеріал попередньо обробляють спеціальними реактивами, наприклад, флюорохромами, що викликають так звану вторинну люмінесценцію. Це дає можливість спостерігати диференційну, більш яскраву люмінесценцію окремих частин клітин (спори, міцелій). Із наважки насіння, відібраного з середнього зразка, виокремлюють насіння основної культури, яке розкладають на чорний папір, поміщають під ультрафіолетовий освітлювач і оглядають. За свіченням насіння роблять попередній висновок про наявність або відсутність захворювання на ньому. Здорове насіння пшениці дає синьо-блакитне або синьо-фіолетове свічення, а насіння значною мірою уражене летючою сажкою, залишається темним (тьмяним). Насіння гороху в місцях ураження аскохітозом, фузаріозом дає тьмяне коричнево-червоне свічення. Уражене фомозом, насіння буряків має на поверхні пікніди гриба, які дають біле матове свічення. Насіння кукурудзи уражене фузаріозом має яскраво оранжеве або малинове свічення. Здорове насіння сої має світло-блакитне свічення.

Ідентифікування хвороб рослин

Усі виділені різними методами збудники захворювання в рослинному підкарантинному матеріалі ідентифікують, користуючись колекціями, визначниками, атласами чи іншою спеціальною літературою.

Під час визначання збудників хвороб основними характерними ознаками є: плями, виразки, розриви, ненормальне розростання тканини та інші патологічні зміни на різних частинах рослин (бульбах, цибулинах, насінні тощо), на яких відсутні ознаки спороношення гриба.

У разі виявлення карантинних видів збудників захворювання у протоколі експертизи у розділі «Фітопатологічні організми» зазначають їх, оформлюють окремий документ-зразок (та препарат) і зберігають на ППКР чи лабораторії.

За результатами оглядання та лабораторної експертизи встановлюють фітосанітарний стан продукції та призначають фітосанітарні вимоги.

Усі виявлені організми поміщають у пробірку, вкладають туди етикетку і зберігають як зразок-документ на ППКР до підтвердження фахівцем лабораторії. В етикетці вказують видову назву виявленого організму латинською та українською мовами, № зразка, під яким його зберігають ча пункті. На виявлені карантинні організми спеціалісти пункту заводять картотеку (за видами, країнами, продукцією), яку складають за систематикою, а некарантинні види систематизують, як порівняльну колекцію вперше виявлених організмів пункту.

Карантинні види направляють у зональну лабораторію для підтвердження. Середні зразки з насінневого матеріалу направляють у закріплені в лабораторії на визначення та підтвердження самостійно виявлених видів. Свідоцтво карантинної експертизи повинно бути видано протягом 3-х днів.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Які Ви знаєте методи мікологічних аналізів?
2. У чому суть макроскопічного методу?
3. У чому полягає біологічний метод?
4. Опишіть методику висівання на поживні середовища?
5. На чому базується люмінесцентний метод?
6. Як проводять стерилізацію поживних середовищ та лабораторного посуду?
7. Які Ви знаєте поживні середовища для грибів?
8. Як проводиться виготовлення мікроскопічних препаратів?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 6

ТЕМА: БАКТЕОРІОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА

Основні цілі:

- знати, що таке бактеріологічна експертиза;
- знати, яка основна мета бактеріологічної експертизи рослинних матеріалів;
- ознайомитись з основними методами бактеріологічної експертизи.

Бактеріологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших збудників бактеріальних захворювань в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, продукти та інші організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України. Бактеріологічна експертиза здійснюється згідно ДСТУ 4709:2006 «Карантин рослин».

Карантинному огляду підлягають усі рослинні матеріали та деякі продукти тваринного походження, що їх імпортують, експортують чи вони проходять транзитом через територію України та у разі здійснення внутрішніх перевезень з карантинних зон.

До підкарантинних матеріалів належать:

- насіння сільськогосподарських, лісових, декоративних, квіткових і дикорослих культур;
- рослини та їх частки (зріз живих квітів, листя, стебла сільськогосподарських культур, живці, кореневища, щепи тощо);
- культури живих грибів, бактерій, вірусів, нематод, кліщів, які є збудниками і носіями хвороб рослин;
- колекції рослин, уражених збудниками хвороб у сухому стані;
- рослинні вкладення у поштові відправлення, багаж пасажирів;
- свіжі овочі, фрукти, ягоди, цитрусові, банани, бульби, цибулини, коренеплоди, баштанні культури тощо;
- саджанці, розсада, горщиківі культури.

Готування зараженого матеріалу до експертизи

На бактеріологічну експертизу відбирають рослинні зразки (насіння, плоди, бульби, цибулини тощо) з найбільш типовими зовнішніми ознаками ураження, з яких потім виділяють збудників бактеріальних хвороб. Застосовують три методи стерилізації поверхні уражених тканин:

- хімічними речовинами – формаліном, спиртом тощо;
- проведення зараженого матеріалу через полум'я спиртівки (фламбування);
- із застосуванням механічного очищення.

Листки і стебла трав'янистих рослин перед виділенням бактерій для визначання збудників бактеріозів не дезінфікують, а ретельно відмивають під сильним струменем водопровідної води, а потім у кількох пробірках зі стерильною водопровідною водою. Міцні, здерев'янілі частини (стебла, корені) дезінфікують етиловим спиртом поверхнево, попередньо добре відмивши від

грунту під проточною водою. Рослинну тканину з однієї пробірки в іншу переносять стерильним пінцетом. Шматочки внутрішніх тканин, взяті від добре відмитих плодів, стебел, коренеплодів або коренів, після зняття стерильним скальпелем покривних тканин не відмивають.

Насіння промивають 15–20 хв під струменем водопровідної води, а потім дезінфікують від поверхневого зараження одним зі способів:

а) насіння занурюють на 3–5 хв у 1 %-вий розчин марганцевокислого калію і промивають кілька разів у стерильній воді;

б) зразок з насінням занурюють на 3–5 хв у 96 %-вий етиловий спирт так, щоб воно не сплигло на поверхню, промивають кілька разів у стерильній воді, обсушують між двома аркушами стерильного фільтрувального паперу.

Виготовлення поживних середовищ для вирощування бактерій

Поживні середовища за своїм складом поділяють на білкові (містять білки тваринного і рослинного походження) та синтетичні, у яких лептонний азот замінений мінеральним.

Середовища для вирощування бактерій відрізняються за рецептурою від середовищ для вирощування грибів. Основна їх відмінність полягає у рівні рН. Так мікологічні середовища повинні мати злегка кислу реакцію, а для культивування бактерій – нейтральну або злегка лужну (рН 7,0–7,5). Наприклад, картопляно-глюкозний агар використовують для вирощування грибів і бактерій. Але для вирощування бактерій він повинен мати рН 7,0–7,2. Стерилізувати його слід 10 хв за тиску 1 атм.

Білкові поживні середовища: *М'ясопептонний бульйон (МПБ), МПБ з селітрою, М'ясопептонний агар (МПА), Зелений агар, МПА з крохмалем, Пептонно-дріжджовий агар, Дріжджовий автолізат, Дріжджова вода, М'ясопептонний желатин (МПЖ), Молоко, Молоко з лакмусом, Картопля, Картопляний агар, Картопляний агар з глюкозою, Картопляний агар з NaCl, Середовище Гіса для визначення бродіння вуглеводів.*

Безбілкові або синтетичні поживні середовища містять мінеральні солі, мінеральний азот у вигляді селітри, солей амонію, амінокислот та їх солей. Як джерела енергії у них додають вуглеводи. Для визначення та вивчення нових видів фітопатогенних бактерій перевірка їх росту на трьох синтетичних середовищах обов'язкова. *Середовище Кона, Середовище Ушинського, Середовище Фермі.*

Методи виділення фітопатогенних бактерій з рослинного матеріалу. Бактеріологічний аналіз слід проводити у чистому приміщенні, де немає руху повітря (сторонні не ходять, двері та вікна зачинені). Робочий стіл накривають склом і звільняють від усіх предметів. Протирають чистою зволоженою ганчіркою, скло дезінфікують спиртом. На столі розставляють у певному порядку необхідний посуд, інструменти та оптику: банку зі спиртом, банку з предметними та покривними скельцями, спиртівку, препарувальні голки, шпатель Дригальського, піпетки, ступку, пробірки зі стерильною водою, загорнуті в папір стерильні чашки Петрі, чашки з поживним агаровим середовищем.

Виділення бактерій з уражених частин рослин

З експериментального зразка відбирають частини рослин із найсвіжішими характерними зовнішніми ознаками ураження. Не можна аналізувати гнилий матеріал, або брати на аналіз частини середини гнилої тканини, бо отримані результати будуть спотворені внаслідок інтенсивного розвитку сапрофітної мікрофлори. Для виділення бактерій шматочки ураженої тканини слід брати тільки на межі зі здоровою. У рослин з ознаками мокрої бактеріальної гнилі з ділянки ураження попередньо знімають зовнішню тканину. Заздалегідь продезінфікованим у полум'ї спиртівки й охолодженим скальпелем чи ножицями вирізують у місці найсвіжішого ураження невеликі ділянки ураженої тканини і розтирають їх у стерильній ступці з невеликою кількістю стерильної води до отримання однорідної маси. Прожареною над полум'ям спиртівки платиновою петлею краплю отриманої маси наносять на поверхню застиглої поживної агару в чашці Петрі. Потім стерильним шпателем Дригальського рівномірно розмазують перенесений матеріал на поверхню агару і цим самим шпателем проводять по поверхні другої і третьої чашок. Закриті чашки перевертають догори дном і ставлять у термостат за температури 26–28 °С. Використані ступки, товчачики і шпателі дезінфікують кип'ятінням.

Бактеріологічний посів

Виділення збудників бактеріозів проводять із зараженого бактеріозом органа рослини. На поживні середовища збудників бактеріозів з хворих рослин висівають різними способами:

- а) висівання розтертою кашницею в рідке поживне середовище для накопичення в ній збудника;
- б) розкладання заражених шматочків тканин на поверхню поживного агару (метод обростання) в чашці Петрі;
- в) висівання розтертою кашницею на поверхні поживного агару;
- г) висівання зразків, взятих із зів'ялих і розрізаних судин рослин, проведенням ними по поверхні поживних середовищ;
- д) посів на поживний агар соку зараженої рослини, взятого шприцом або вичавленого із соковитих частин рослин (цибулини, бульби, плоду тощо).

Способи бактеріологічної експертизи. Бактеріологічна експертиза визначає ураженість підкарантинного рослинного матеріалу фітопатогенними бактеріями і може бути проведена такими способами: анатомічним, макроскопічним, біологічним, серологічним і люмінесцентним.

Анатомічний метод застосовують для виявлення внутрішньої ураженості шляхом мікроскопування незабарвлених і забарвлених зрізів внутрішніх тканин.

Діагностику збудників бактеріозів проводять методом зафарбованих зрізів тканин хворих рослин за Грамом. Усі досліджувані стебла рослин розрізають на невеликі шматочки (від 5 до 7 см), ретельно оглядають поперечні зрізи, звертаючи особливу увагу на потемніння судинної системи. Шматочки з такими плямами в потемнілих місцях розрізають гострим скальпелем. З потемнілих ділянок бритвою або скальпелем роблять повздовжні тонкі зрізи і розкладають їх на предметні скельця з краплями води (якщо матеріал свіжий,

додавання води не обов'язкове). З м'якуша плодів і з плодоніжки зрізи роблять у такий самий спосіб.

Препарати висушують у термостаті або за кімнатної температури, фіксують триразово в полум'ї горілки або спиртівки, після охолодження заливають спиртом, залишають на повітрі до повного випаровування і фарбують за Грамом. Зафарбовані препарати оглядають під мікроскопом з імерсійною системою.

Метод макроскопічного (зовнішнього) огляду

Уражені частини рослин оглядають за допомогою лупи, відбираючи зі зразка пласкі, недорозвинені, з різними плямистостями, зміненим забарвленням насінини, і ті частини рослин, що підозрюються на захворювання, спричинені бактеріями. Уражені частини рослин оглядають за допомогою лупи. Цей метод дає можливість відібрати зі зразка насіння щупле, недорозвинене, з різними плямистостями або зміною кольору, а також інші частини рослини з підозрою на ураження бактеріозом. У деяких випадках зовнішні прояви хвороби мають настільки характерний вигляд, що за цими симптомами можна зробити висновок про збудника хвороби. У разі ураження насіння бактеріозом зовнішні ознаки іноді відсутні, тому можливість використання цього методу дуже обмежена.

Біологічний метод застосовують за потреби виявлення внутрішньої (прихованої) ураженості насіння чи інших частин рослин бактеріозами. Насіння, відібране для аналізу, кладуть у вологу камеру або висівають на поживний агар чи стерильний пісок. У такому разі ураженість насіння встановлюють за проявом ознак на сходах. Насіння, відібране і підготовлене для аналізування, поміщають у вологу камеру або висівають на живильний агар чи в стерильний пісок.

Добре промиті сухі чашки Петрі або фаянсові ростильні вистилають ватою товщиною 0,25 см і покривають марлею або фільтрувальним папером, стерилізують та звожують підстилку стерильною водою. Чашки Петрі поміщають у термостат. Якщо через деякий час на насінні утворюється ексудат або насіння ослизнюється, то асептично петлею беруть краплю ексудату і переносять у пробірку з невеликою кількістю стерильної води. Пробірки струшують і роблять посів на три чашки Петрі (одна із зеленим агаром).

Уражені частини рослин та насіння розтирають у стерильній ступці з невеликою кількістю стерильної води. Одержану кашицю фламбованою бактеріологічною петлею переносять на тверде поживне середовище. Поміщають у термостат, витримують за температури плюс 28–30 °С.

Після завершення встановленого строку росту колоній проводять ідентифікацію збудників бактеріальної хвороби.

Люмінесцентний метод полягає у тому, що здорові й уражені будь-яким збудником рослинні тканини однієї й тієї ж рослини по-різному відображуються в ультрафіолетових і синьо-фіолетових променях після обробки специфічними сироватками. У ряді випадків метод дає змогу швидко виявити збудника хвороби. Насіння підготовлене для аналізу розсипають або розкладають в один ряд на фотографічному папері або оксамиті і переносять

безпосередньо в поле ртутно-кварцової лампи. Відстань між лампою і насінням повинна бути попередньо відрегульованою – на 15–30 см.

Здорове насіння через кілька хвилин дає яскраву, рівну флуоресценцію. Заражене бактеріями чи іншими збудниками насіння флуоресценції не дає, воно залишається темним чи тьмяним. Відсутність флуоресценції характерна для насіння, ураженого патогенними бактеріями, грибами, а також за підвищеної вологості та наявності на ньому сапрофітної мікрофлори.

За світінням насіння роблять попередній висновок про наявність або відсутність збудника хвороби. Кільцеву гниль картоплі легко виявити на розрізі бульб за яскравою сріблясто-зеленуватою люмінесценцією судинного кільця в ультрафіолетових променях. У здорових бульб – судинне кільце не люмінесцює.

Серологічні способи засновані на властивості виділеного штаму бактерій, який спричинює хворобу позитивно реагувати на сироватку, імунну до штаму цих бактерій. Серологічним методом здійснюють лабораторну діагностику бактеріальних захворювань, використовуючи реакції аглютинації і преципітації. Для цього беруть чисті культури бактерій, виділені з уражених тканин, або екстракт з цієї тканини і сироватку, імунну щодо підозрілого збудника хвороби.

Аглютинація – склеювання мікроорганізмів і випадіння їх у вигляді пластівців в осад під дією аглютинувальної сироватки.

Реакцію аглютинації здійснюють різними способами: макроскопічним у пробірках; мікроскопічним у роздавленій або висячій краплі на предметному скельці. Для проведення макроскопічної реакції аглютинації в пробірках необхідно мати аглютинувальну сироватку, агарову культуру бактерій, фізіологічний розчин, градуйовані на 1 мм і 10 см³ піпетки з поділкою на десяти долі міліметра, пастерівські піпетки і набір чистих пробірок.

У пробірці додають по 0,1 см³ мікробної суспензії, приготованої на фізіологічному розчині. Пробірки ретельно збовтують і поміщають у термостат на 2 год за температури 37 °С, після чого відмічають попередні результати реакції аглютинації і залишають на добу за кімнатної температури для одержання остаточних результатів реакції аглютинації.

Для огляду результатів реакції аглютинації використовують аглютиноскоп або дзеркало від мікроскопа. Рідина в пробірках після струшування повинна бути рівномірно каламутною. Наявність реакції аглютинації відмічають за її інтенсивністю певною кількістю плюсів.

(++++) – повне освітлення рідини; бактерії осіли на дно у вигляді парасольки;

(+++) – така сама картина, як і в першому випадку, але спостерігається слабка опалесценція з невеликою кількістю бактерій, які не осіли на дно;

(++) – бактерії осіли на дно приблизно на 50 %; у каламутній рідині плавають бактерії, які не склеїлись;

(+) – невеликий осад на дні; у рідині спостерігається незначна кількість бактерій, які не склеїлись;

(–) – відсутність реакції аглютинації; каламуть, як і в контролі.

Так, серологічним методом можна швидко визначити *Erwinia amylovora*, *Corynebacterium sepe-donicum*, *Pseudomonas atrofaciens*, *Pseudomonas*

citriputeale, *Pseudomonas phaseolicola*, *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas phaseoli*.

Ідентифікація фітопатогенних бактерій. Усі виділені збудники хвороб у рослинному підкарантинному матеріалі визначають, користуючись колекціями, визначниками, атласами чи іншою спеціальною літературою. Для остаточної ідентифікації враховують комплекс ознак (табл. 3).

Таблиця 3

Карантинні та потенційно небезпечні бактеріальні захворювання та їх збудники і продукція з якою вони поширюються і шкодять

Назва хвороб		З якою рослинною продукцією поширюється і шкодить
Українська	Латинська	
Жовтий (слизистий) бактеріоз пшениці	<i>Corynebacterium tritici</i> (Hutch) Burkh	З ураженим насінням, ґрунтом та галами пшеничної нематоли
Бактеріальне в'янення кукурудзи	<i>Erwinia stewartii</i> (Smith) Dye	З ураженим насінням, комахами-резерваторами, з рослинними рештками, дощем та вітром
Бактеріальний вілт гвоздики	<i>Burkholderia caryophylli</i> (Burkholder) et al	З ураженим садивним матеріалом, рослинними рештками, комахами, а також з ґрунтом, в якому збудник зберігається
Бура гниль картоплі	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al	Джерелом інфекції збудника є ґрунт, уражені рослинні рештки і насіннєві бульби, вода. Резерваторами інфекції є бур'яни з родини пасльонових, бобових
Жовта хвороба гіацинтів	<i>Xanthomonas campestris pv hyacinthi</i> (Wakker) Dovson	З хворими цибулинами, дощем, через інструменти, а також комахами. Бактерії проникають у рослину крізь дрібні поранення та прорихи
Бактеріальний опік рису	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzicola</i> (Ishiyama) Swings et al	З насінням та ураженими рослинами
Бактеріальна строкатість рису	<i>Xanthomonas oryzae pv. oryzicola</i> (Fang et al.) Swings et al	З насінням, ураженими рослинами та рослинними рештками
Бактеріоз винограду (хвороба Пірса)	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al	З ураженим садивним та щеплювальним матеріалом, рослинними рештками, комахами
Бактеріальне в'янення винограду	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al	З рослинними рештками, ураженими рослинами, інструментами, садивним матеріалом
Карантинні організми, обмежено поширені в Україні		
Бактеріальний опік плодів	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al	З садивним матеріалом та прищепами, комахами, птахами, дощем та вітром. Вірогідність ураження зростає у разі недотримання правил дезінфекції під час обрізування дерев

Карантинні та потенційно небезпечні бактеріальні захворювання та їх збудники і продукція з якою вони поширюються і шкодять у разі виявлення карантинних чи потенційно-небезпечних видів збудників хвороб їх зазначають у протоколі експертизи, оформлюють окремий документ-зразок (у вигляді препарату) і зберігають на ППКР чи в лабораторії. Виявлені збудники хвороб некарантинних видів заносять у протокол експертизи та у разі потреби використовують для колекцій.

Заходи за результатами експертизи. На підставі результатів карантинної експертизи, отриманих вищезазначеними методами, і оформленого свідоцтва карантинної експертизи уповноважені відповідних державних органів карантину рослин приймають рішення щодо ураженості збудниками бактеріальних хвороб підкарантинного рослинного матеріалу: проведення його очищення чи способів переробки, знищення чи негайного повернення відправникові, не допускаючи на територію України чи у вільні від карантинних організмів зони України. Рішення державних органів карантину рослин України на території обов'язкові для негайного виконання всіма організаціями, установами, господарствами та суб'єктами господарчої чи підприємницької діяльності.

Вимоги щодо безпеки. Під час проведення експертизи рослинного підкарантинного матеріалу використовують спецодяг, засоби індивідуального захисту. Необхідно дотримуватись правил безпеки роботи з тими чи іншими матеріалами згідно з відповідними інструкціями. Електрообладнання (термостати, сушильні шафи тощо) повинні бути заземлені, і роботи з ними необхідно виконувати відповідно до чинних інструкцій з техніки безпеки. Роботи з хімічними сполуками, особливо з ефіром та реактивами (розчини солей), необхідно проводити у витяжній шафі чи добре провітрюваному приміщенні відповідно до чинних інструкцій з техніки безпеки під час роботи з ними.

Контрольні питання для самоперевірки

1. У чому полягає суть бактеріальної експертизи?
2. Як підготувати лабораторний посуд?
3. Опишіть технологію виготовлення поживних середовищ для вирощування бактерій.
4. Які Ви знаєте білкові та безбілкові поживні середовища?
5. Назвіть реактиви, фарби та індикатори для визначення бактерій.
6. Які реактиви використовують для фарбування за Грамом?
7. Назвіть методи виділення фітопатогенних бактерій з рослинного матеріалу.
8. Коли застосовують біологічний метод?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 7

ТЕМА: ВІРУСОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА

Основні цілі:

- ознайомитись з основами вірусологічної експертизи;
- ознайомитись з основними методами діагностики вірусних захворювань рослин.

Вірусологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших збудників вірусних захворювань в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, продукти та організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України. При проведенні вірусологічної експертизи спеціалісти керуються Діагностичними протоколами ЕРРО РМ 7. Для проведення експертизи використовують імуноферментний метод (ІФА).

Віруси рослин – субмікроскопічні облигатні паразити, які не мають власного обміну речовин. Діагностика вірусних захворювань досить складна. Це пов'язано з їх мікроскопічними розмірами і нездатністю розмножуватися поза клітиною. Віруси овочевих і технічних культур здебільшого легко передаються через механічні пошкодження з соком хворої рослини. Механічна передача вірусів плодів без додавання стабілізуючих речовин неможлива, бо в листках плодів культур містяться дубильні й інші речовини, що інактивують віруси. На різних рослинах один і той самий вірус викликає нехарактерні ознаки. З підвищенням температури й інтенсивності освітлення скорочується час, необхідний для прояву ознак вірусної хвороби.

У практичній фітопатології трапляються вірусні хвороби рослин типу мозаїки. До них належать: власне мозаїка, кучерявість, деформація листків, жилкова мозаїка, штрихуватість, кільцева плямистість, некротична плямистість, некротична кільцева плямистість.

Встановити вірусну природу хвороби лише за зовнішніми ознаками не завжди вдається, тому поєднують різні методи діагностики.

МЕТОД ІНДЕКСАЦІЇ

Метод індексації застосовують для встановлення вірусної природи збудника взимку в частинах рослин, що перебувають у стані спокою: бульбах, цибулинах, коренях, кореневищах багаторічних рослин. Для аналізу відбирають проби садивного матеріалу (вічка, корені, кореневища, стебла), висаджують у ґрунт у горщики, ящики чи стелажі і пророщують в оранжерей або теплиці за оптимальних умов. Якщо піддослідний садивний матеріал уражений вірусами, то вирощені рослини будуть мати характерні ознаки тієї чи іншої хвороби, за якими можна встановити ступінь ураження садивного або маточного матеріалу і зробити висновки про доцільність його використання.

Під час вірусологічної експертизи належить стежити, щоб в оранжерей не було переносників вірусів (комахи, нематоди, кліщі), здатних заразити здорові рослини і тим самим сформувати хибне уявлення про ураження. Для усунення переносників в оранжерей до закладання дослідів здійснюють обробки інсектицидами. Бажано простерилізувати ґрунт за допомогою пропарювання.

Інструменти, якими користуються при живцюванні і вирізуванні вічок, слід знезаразити 2% розчином формаліну, лізолом або 1% розчином соди. Працівникам слід користуватися гумовими рукавицями, які знезаражують.

ПЕРЕНЕСЕННЯ ВІРУСУ ПОВИТИЦЕЮ

У разі необхідності передачі вірусу рослині, далекій за систематичним положенням, використовують повитицю як переносника вірусу. Повитиці розводять на однорічних рослинах (буряках, петунії, махорці), які швидко ростуть у ящиках. Після того, як рослина-паразит добре розростається, відривають частину її стебла завдовжки 10–12 см і переносять на хворі рослини, обвиваючи їх по можливості. Через п'ять–сім днів повитиця утворює гаусторії, а ще через 7–10 днів починає рости і з'являються нові стебла. Ці нові стебла переносять на здорові рослини. Повитицею вдається заразити не кожен рослину, тому заражувати слід не менше 10 екземплярів. Бувають також випадки, коли повитиця не здатна паразитувати на рослині.

Цей метод можна використовувати лише у спеціалізованих вірусологічних лабораторіях з дотриманням відповідних правил, оскільки повитиця є карантинним бур'яном.

МЕТОД ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

За допомогою електронного мікроскопа можна встановити розміри, форму і структуру віріонів, виявити їх концентрацію в тканинах хворих рослин і температуру інактивації віріонів фітопатогенних вірусів. У ряді випадків метод може бути застосований для виявлення прихованої зараженості вірусом. Для приготування препаратів у лабораторії мають бути круглі сітки з електроосащеної міді діаметром 2 або 3 мм, залежно від марки мікроскопа, реактиви для плівки – підложки-колоїд й амілацетат (бутилоаміловий ефір).

ПЕРЕДАВАННЯ ВІРУСІВ КОМАХАМИ

Переважає більшість вірусних захворювань передається комахами-переносниками. Однак їх роль не обмежується перенесенням заразної основи. Переносники можуть бути резерватами вірусу, в яких він тривалий час зберігається і розмножується.

Без переносників у природі вірусні інфекції не матимуть підтримки. За характером живлення і будовою ротового апарату комах-переносників ділять на сисних та гризучих.

Сисні комахи – найактивніші – здійснюють тонку інокуляцію рослин, за якої клітини залишаються живими, а введений у них вірус зберігає здатність розмножуватися, пересуватися в інші клітини, тканини, органи, спричиняючи важкі пошкодження рослин, що навіть призводить до їх загибелі.

Перше місце за кількістю переносників і передачі ними вірусів займають попелиці (150 видів). Вони здатні тривалий час зберігати в собі вірусну інфекцію, тобто бути її резерватами. Ними механічним і біологічним способами передається більше 100 вірусів. При механічному – вірусні частинки адсорбуються на хоботку комах, і після одно–п'ятихвилинного живлення на хворій рослині можливе зараження здорових рослин у наступні п'ять хвилин. Процес інфікування і передачі вірусу відбувається дуже швидко, однак і швидко втрачається інфекційність. Для її відновлення необхідне повторне живлення хворою рослиною. У разі виявлення переносників вірусної хвороби

насамперед вивчають фауну сисних комах, пов'язаних з ураженою вірусом рослиною. Для цього щотижня, починаючи з моменту появи перших комах після зимівлі, проводять ретельні збори комах і кліщів.

Для масових зборів використовують планшети розміром 50×50 см, обтягнуті з одного боку ватою. Планшети ставлять під кутом 45°C до рослини і рукою струшують усіх комах. Потрапляючи на планшет, комахи заплутуються у ваті, їх відловлюють пробіркою або спеціально виготовленим аспіратором.

Зібраних членистоногих досліджують в особливих ізоляторах, складених з дерев'яного каркасу і обтягнутих марлею або капроном (залежно від розміру комахи). Висота ізолятора визначається висотою дослідних рослин, а площа має становити $1,0 \times 0,5$ м. Ізолятори розміщують у полі на спеціальному майданчику, очищеному від бур'янів. Зібраних комах складають у тканинний мішечок і вкладають туди листки зараженої рослини. При вільному вміщенні комах в ізолятори вони розсіюються по стінках і можуть легко вийти через вузькі щілини, нещільні ділянки тканини, пори ґрунту, не заразивши рослину. За проявом хвороби регулярно спостерігають. Ізолятори з рослинами, на які не випускали комах, є контролем.

В дослідах з передачі вірусів попелицями частіше використовують стерильних комах. Стерильних попелиць виводять у чашках Петрі на листках, зірваних зі здорових рослин і покладених на вологий фільтрувальний папір. За таких умов помірно зволожені листки можна тримати чотири–п'ять днів, а потім підкладати нові, на які попелиці легко переходять. Від попелиць, узятих у чашки Петрі першими, можна отримати кілька поколінь. Стерильних попелиць підсаджують для інфікування на листки середніх ярусів хворих рослин із добре розвиненими ознаками інфекції. Попелиць після певного періоду живлення хворими рослинами та голодування переносять на здорові рослини-індикатори. Рослини, на які підсаджували попелиць, що живилися здоровими рослинами, є контрольними. Далі спостерігають за проявом ознак хвороб. Крилаті форми попелиці – активні переносники вірусних захворювань.

Комахи з *гризучим* ротовим апаратом не є активними переносниками. Вони передають віруси механічно (у їх організмі віруси зберігаються протягом 0–14 днів).

МЕТОД ВКЛЮЧЕННЯ

Метод включення полягає в тому, що в клітинах, пошкоджених вірусами, або в соку утворюються кристалічні чи аморфні тіла, яких немає у здорових рослин. У цитоплазмі утворюються клітинні включення, зрідка вони є у ядрах клітин різних тканин і органів рослин – листках, стеблах, коренях, квітках. Вірус здатний утворювати включення різної форми в одній і тій же рослині. Інколи характер кристалізації вірусу залежить від рослини-господаря. За цими включеннями можна діагностувати 64 віруси. Зрізи з поверхневих тканин і волосків кладуть на предметне скло, піпеткою наносять краплю води і розглядають під мікроскопом. Іноді утворенню кристалів вірусів у хворих клітинах сприяє додавання 0,1 %-вого розчину соляної або сірчаної чи 3 %-вої щавлевої кислоти. Аморфні і кристалічні включення набувають темно-синього забарвлення у разі обробки їх трипановою синьою фарбою. Зрізи з епідермісу і

волосків обробляють 0,5–0,05 %-вим розчином трипану синього у фізіологічному розчині протягом 15–30 хвилин.

СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД

Серологічний метод ґрунтується на тому, що віруси у разі введення в організм тварин здатні в крові утворювати антитіла. Сироватки, одержані з крові імунізованих тварин, мають здатність вступати в специфічні реакції з вірусами. Метод можна застосовувати для виявлення прихованого вірусоносія. На сьогодні одержано сироватки більш ніж для 30 вірусів, в основному тих, що спричиняють хвороби типу мозаїк. Нині сироватки виготовляють у лабораторіях у вигляді концентрованої рідини або сухого порошку, отриманого за спеціального сушіння. Запаєні ампули з сироваткою при розсиланні супроводжуються інструкцією з використанням її у роботі. Рідкі сироватки в ампулах зберігають у холодильнику. Вони придатні для використання лише до помутніння рідини. Сухі сироватки можуть зберігатися роками.

Реакція взаємодії антитіл сироватки і антигена (тобто вірусу, що міститься у соку хворої рослини) проявляється у вигляді пластівцевого осаду. Розрізняють два типи реакції: преципітації (осідання) та аглютинації (склеювання). Реакція преципітації відбувається під час змішування сироватки з прозорим, очищеним від сторонніх домішок, соком рослини, ураженої вірусом. Для реакції аглютинації використовують і неочищений сік, з яким вона відбувається швидше і випадає в осад, тому для практики ця реакція найбільш придатна.

Метод краплинних реакцій. 2–5 г листків розтирають у невеликій ступці. Розтерту масу вміщують у невелику пробірку або скляночку. На предметне скло наносять по дві краплини сироватки: ліворуч – нормальної, виготовленої із крові здорової тварини, до введення вірусу; праворуч – діагностичної антисироватки.

Поряд із кожною краплиною вміщують одну краплю соку рослин. Усі краплі мають бути однакового розміру. За допомогою чистої скляної палички або голки для ін'єкцій змішують спочатку краплі соку та нормальної сироватки, а потім соку та антисироватки. Скло зі змішаними краплями ставлять у вологу камеру на 5–15 хв, залежно від кімнатної температури. Після чого оглядають під бінокуляром: якщо рослина має вірус, то в краплі із сироваткою утворюється бавовноподібний осад.

Контрольні питання для самоперевірки

1. У чому полягає вірусологічна експертиза?
2. Які є методи діагностики вірусних захворювань рослин?
3. У чому суть методу індексації?
4. З якою метою проводять зараження рослин за допомогою щеплення тканини хворої рослини?
5. Навіщо проводять перенесення вірусу повитицею?
6. У чому метод електронної мікроскопії?
7. Як проводять передавання вірусів комахами?
8. У чому суть методу включення?
9. Опишіть серологічний метод.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 8

ТЕМА: ФІТОГЕЛЬМІНТОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА

Основні цілі:

- ознайомитись з основами фітогельмінтологічної експертизи;
- ознайомитись з основними методами виявлення паразитичних нематод.

Фітогельмінтологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших видів фітопаразитичних нематод в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, ґрунт, продукти та інші організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України.

Фітонематоди здатні викликати масові ураження сільськогосподарських культур, знижувати якості насінневої та товарної рослинної продукції. У залежності яку частину рослин використовують нематоди для живлення вони діляться на кореневі, стеблові та листові. Живлення нематод викликає хворобу – фітогельмінтоз. Методика проведення фітогельмінтологічної експертизи залежить від досліджуваного матеріалу. Основними методами експертизи є візуальний, лійковий, флотаційний.

Мета фітогельмінтологічної підкарантинної експертизи – встановити зараженість рослинного матеріалу і ґрунту карантинними та іншими видами паразитичних нематод. Цій експертизі підлягає увесь садивний матеріал: укорінені рослини, саджанці, розсада, бульби, цибулини, кореневища, живці чорної смородини чи інших кущів, насіння; зразки ґрунту з полів; ґрунт на підземних органах рослин або у вигляді домішок серед насіння.

На гельмінтологічну експертизу передають зразки середньої проби підкарантинної продукції, ґрунту чи змітки, що вже пройшли ентомологічну та фітопатологічну експертизу. А також відібрані зразки ґрунту з полів, уражені рослини або їх частини.

Техніка фітогельмінтологічного лабораторного аналізу

Обладнання. Для фітогельмінтологічної експертизи необхідно мати оптичні прилади, апаратуру, дрібний допоміжний інструментарій і посуд, а також деякі реактиви і матеріали.

До комплекту оптичних приладів входять біологічні мікроскопи, бінокляри, штативи, ручні і налобні лупи, малювальний апарат.

З апаратури необхідні: сушильна шафа, термостат, центрифуга, прилад Фенуїка, шафа для препаратів, технічні терези з набором гир, штатив для лійок.

Підготовка лабораторного посуду. Весь лабораторний посуд й інструменти перед кожним черговим аналізом мають бути чистими. Скляний і емальований посуд, гумові трубки, піпетки, пробірки, металеві сита і сітки слід промити, а потім прокип'ятити у воді протягом 10 хв, після чого обполоснути чистою водою і просушити на повітрі або в сушильній шафі при температурі 50°C. Інструменти протирають 96 %-вим спиртом або миють у гарячій воді.

Правила карантинної профілактики в основному такі, як і при фітопатологічній експертизі.

Виділення червоподібних нематод із рослинного матеріалу. Лійковий метод є найбільш розповсюдженим методом виділення червоподібних нематод. Для цього достатньо мати лійку з гумовою трубкою на кінці (довжина – 10–15 см), у нижній кінець якої вставлена маленька пробірка відповідного діаметра для збирання виділених нематод.

Лійку з гумовою трубкою і пробіркою встановлюють у вертикальному положенні, найкраще – в штативі з отвором для лійок. Для затримання розщеплених частин аналізованих рослин у кожен лійку вставляють сітку з тонкого латунного дроту з отворами 1–3 мм. На сітку кладуть попередньо підготовлений матеріал і заливають водою так, щоб вона вкрила все у сітці. Вода повинна мати температуру близько 30 °С, оскільки при цьому рухливість більшості фітонематод зростає. Належить стежити, щоб при наливанні води в лійку в трубці не затримувалося повітря, видавлюючи його пальцями. У лійку кладуть етикетку з номером експертизи і назвою матеріалу. Нематоди, які виходять у воду з аналізованого матеріалу, провалюються в отвори сітки і опускаються на дно пробірки. Через 6–24 годин пробірку обережно, щоб не збовтати, виймають з трубки.

Верхній шар води обережно зливають, а залишкову частину (заввишки 1,5–2,0 см) переносять за допомогою піпетки на предметне скло і оглядають під біноклем на наявність нематод. Замість пробірки на нижній кінець трубки можна прикріпити затискач Мора. При цьому нематоди, які вийдуть у воду з аналізованого матеріалу, опускаються і накопичуються всередині гумової трубки над затискачем. Через 6–24 годин затискач відкривають, частину води, що знаходиться над ним, випускають у підставлений бюкс, або маленьку бактеріологічну чашку і оглядають під біноклем на наявність нематод. Воду збирають у пробірку і центрифугують одну хвилину. Осад піпеткою вибирають, кладуть на предметне скло і переглядають під біноклем.

Лійковим методом виділяють личинок нематод, здатних до активного руху зі свіжого, не фіксованого рослинного матеріалу та сухих рослин, попередньо розмочених. Виділення нематод із рослин можливе також у різному посуді. Розщеплену рослину (або окремі частини) кладуть у посуд, заливають водою і залишають на три–чотири години. Нематоди, які залишають рослинні тканини, опускаються на дно. Рослини, або їх частини, вилучають пінцетом і після цього відстоюють воду протягом 30 хв. Верхній шар води обережно зливають, а нижній (заввишки 1–3 см) досліджують на наявність нематод, послідовно переливаючи в чашку Петрі і оглядаючи під біноклем невелику кількість рідини. Якщо до вилучення нематод, виявлених у рідині, не можна приступити одразу, то пробу фіксують 4–6 % розчином формаліну. На етикетці зазначають дату фіксації.

Нематод легко виявити в чітко виражених уражених тканинах. Для цього уражену ділянку розтинають під біноклем чи лупою стальними препарувальними голками в чашці Петрі, додавши води. Через 20–30 хв воду оглядають на наявність нематод. Виявлених нематод переносять на предметне скло для ідентифікації під мікроскопом. Для цього нематоду захоплюють тонкою препарувальною голкою з дна посуду, підтягують до плівки

поверхневого натягу води, і швидким рухом переносять її на предметне скло в краплю води, накривши покривним склом.

Для вилучення червоподібних нематод, які живуть у ґрунті навколо коренів рослин, з проби, відібраної для аналізу, на наявність цистоутворюючих нематод виділяють 1–10 см³ ґрунту і просіюють через сито з отворами 1–2 мм. Після цього ґрунт висипають у склянку і розмішують у 10–100 мл води. Сухий ґрунт змочують і витримують до повного розмокання частинок (дві години), після чого промивають на ситі. Вологий ґрунт можна промити одразу. Осад, що залишився на ситі після промивання, змивають у чашки Петрі і весь оглядають на наявність нематод під бінокелем чи лупою. Якщо нематод з осаду не можна вибрати одразу, його фіксують. Виділяти червоподібних нематод з ґрунту можна лійковим способом. Щоб отримати чистий осад з 1–10 см³ ґрунту, його попередньо замочують у воді, кладуть на молочний фільтр або в марлевий мішечок і переносять на металеве сито, обережно занурюючи в лійку, попередньо наповнену чистою водою. Через одну–дві доби пробірку виймають з гумової трубки, і воду з неї оглядають під бінокелем на наявність нематод. Краще оглядати ґрунтові проби вагою 1 г, розбавлені в скляній чашці невеликою кількістю води. Крім описаних методів можна застосовувати центрифугування і просіювання.

Виготовлення мікроскопічних препаратів із червоподібних нематод

Тимчасові препарати. Нематод краще ідентифікувати в живому стані. Нематоду кладуть на предметне скло у краплину води і три–чотири волокна скляної вати, товщина яких приблизно така, як і товщина досліджуваних нематод, і накривають покривним скельцем. Воду можна додавати піпеткою з краю покривного скла. Щоб можна було визначити і виміряти нематод, необхідно припинити їх рух. Для цього предметне скло з нематодами обережно нагрівають зісподу над невеликим полум'ям спиртової горілки протягом п'яти–шести секунд до припинення руху нематод, але ні в якому разі не доводять докипіння. Можна також зупинити рух нематод, додавши під покривне скло одну краплю 1 % розчину хлоралгідрату.

Перед виготовленням тимчасових препаратів з фіксованого матеріалу бажано останній підігріти протягом 5 хв на водяній бані при температурі 55 °С. Попереднє підігрівання матеріалу дає змогу прискорити «освітлення нематод». Після цього нематод виймають з фіксуєчої рідини, кладуть на предметне скло в краплю дистильованої води, краще – з додаванням гліцерину (від 6 до 50 %), накривають зверху теплим покривним склом і залишають у цій суміші, доки вода не випарується, а нематоди не стануть достатньо прозорими і не зникнуть зморшки кутикули (1–10 днів). Слід враховувати, що об'єм розчину гліцерину зменшиться за випаровування води, тому під покривне скло необхідно додати краплю чистого гліцерину. Для фарбування нематод у розчин гліцерину додають краплю метиленової сині. Після визначення нематод відмивають від гліцерину у воді і знову вміщують у пробірку з фіксуєчою рідиною для зберігання.

Постійні мікропрепарати. Перед виготовленням постійних мікропрепаратів нематод з фіксуєчої рідини переносять на предметне скло в краплю дистильованої води з гліцериним (одна частина гліцерину на 16 частин

води) або краплю суміші з трьох частин 96 % спирту і однієї частини гліцерину, де й залишають на кілька днів при температурі 20 °С до просвітлення нематод і повного випаровування води чи спирту. Після цього на предметне скло додають краплю гліцерину, а навколо нематод кладуть волокна скляної вати такої самої товщини, як нематоди, і накривають теплим покривним склом.

Для кращого зберігання постійних мікропрепаратів їх окантовують з країв покривного скла лаком. Ділянки препарату, у яких містяться нематоди, рекомендується зісподу предметного скла обвести тушшю та наклеїти етикетки.

Вимірювання нематод. Розміри частин тіла і співвідношення між ними мають велике значення для визначення нематод. Вимірюють їх за допомогою окулярного мікрометра. Необхідно виміряти: довжину тіла від головного кінця до кінчика хвоста, ширину тіла в області вульви у червоподібних самиць і найбільшу ширину тіла у самців і самиць родів *Heterodera*, *Meloidogyne*, довжину стравоходу від головного кінця до основи бульбуса, довжину хвоста від ануса до кінчика хвоста, відстань від головного кінця до вульви (вона позначається у відсотках від загальної довжини тіла). На основі цих даних і морфологічного опису визначають нематод.

Виявлення паразитичних нематод. Усі підземні частини рослин: бульби, цибулини, корені тощо оглядають на наявність нематодних захворювань.

Корені рослин проглядають на наявність галової нематоди *Meloidogyne spp.* Гали можуть бути різних розмірів – від міліметра до кількох сантиметрів у діаметрі. Самиця галової нематоди опукла, колбоподібної або грушоподібної форми, мутно-білого кольору, з тонкою кутикулою (завдовжки близько 1,0 мм, завширшки 0,6 мм). Вона буває цілком зануреною в тканину ураженого органу. Запліднені самиці через статевий отвір виділяють слиз, що твердіє зовні і перетворюється на щільну крапельку, в яку відкладають яйця, утворюючи на задньому кінці тіла яйцевий мішок коричневого кольору, який виступає на поверхні ураженого органу. Виявлені на коренях рослин гали кладуть на предметне скло у краплю води. Під біокуляром знаходять яйцевий мішок. З проти-лежного боку двома препарувальними голками обережно розривають гал. Не можна при цьому пошкоджувати тонку кутикулу самиці. З розщепленого гала у воду випадає самиця, а із зруйнованого яйцевого мішка – яйця і личинки.

Для виявлення галової нематоди бульби картоплі з ознаками прояву хвороби розрізують на дві частини. Самиці зосереджені в поверхневому шарі зараженої бульби у межах до 0,5 см. Уражені ділянки у вигляді світлих крапок зішкрябують і проглядають під біокуляром на наявність самиць або яєць галової нематоди. Пшенична нематода (*Anguina tritici* Filipjev) не занесена до карантинного переліку. Але вид дуже шкідливий і переносить збудників жовтого слизистого бактеріозу пшениці (*Corynebacterium tritici*).

Зразок зерна висипають на скло і проглядають на наявність галів пшеничної нематоди, яких легко відрізнити за формою і розміром. Вони коротші за пшеничне зерно, мають на одному кінці загострені паростки, що легко обламуються, коричневі або майже чорні. На відміну від мішечків летючої сажки (*Ustilago tritici*), що легко розчавлюються між пальцями, гали пшеничної нематоди тверді. Для визначення пшеничної нематоди гал необхідно

розрізати навпіл у краплі води. З нього має вийти біла борошниста маса, що складається з великої кількості личинок, які добре простежуються під мікроскопом. Личинки через кілька годин починають активно рухатися.

Для виявлення стеблової нематоди (*Ditylenchus destructor* Thorne) на ранній стадії розвитку з бульб картоплі (найкраще в області пуповини) обережно знімають тонкий шар шкірки. За наявності стеблової нематоди в м'якуші бульб помітні білі плями розміром з головку шпильки – місця скупчення нематод. На пізніших стадіях розвитку хвороби крізь шкірку бульби просвічуються слабкі, ледь помітні свинцево-сірі плями. З розвитком нематоди шкірка над плямами розривається, утворюються тріщини зі світло-коричневою нещільною тканиною. Якщо розрізати таку бульбу навпіл, то на поверхні зрізу видно сірувато-коричневу масу хворої тканини. Скупчення паразитичних нематод виникає на межі здорової частини бульби з ураженою. Для аналізу беруть тканини з ділянок здорової частини бульби, що прилягає до хворої, і кладуть на предметне скло в краплю води, накривають покривним, і проглядають під мікроскопом.

Нематод виділяють лійковим методом. Цибулини із зовнішніми ознаками ураження розрізують, ділянки хворої тканини закладають у лійки, або безпосередньо в краплю води для виділення нематод.

Підземні частини рослин переглядають під біноклем або з допомогою лупи на наявність цистоутворюючих і галових нематод. Від кореня чи кореневища відрізують ділянки вагою 10–20 г і промивають водою у невеликому посуді. Відмиті ділянки розрізують на дрібні частини і закладають у лійки на 24–36 годин для виділення червоподібних корневих нематод, які належать до родів *Longidorus*, *Xiphinema*, *Trichodorus* та інші. Для виділення нематод із води, що за-лишилася після відмивання коренів та кореневищ, її пропускають через два сита з отворами 1–2 і 0,01–0,04 мм. Виділяти нематод з ґрунту можна лійковим методом.

Аналіз ґрунту на зараженість картопляною нематодою. Для виділення цист картопляної нематоди з просушеного ґрунту застосовують флотаційний метод, що ґрунтується на здатності цист спливати на поверхню води.

Ґрунт просушують до повітряно-сухого стану при температурі невище 40 °С. Глиняні та мулисті ґрунти просихають повільно і при висиханні твердіють, тому їх слід щоденно перемішувати, подрібнюючи великі грудки. Після цього пробу просіюють через сито, що має отвори 2–4 мм, для видалення великих частин і різних домішок. Потім беруть наважку 100 см³, висипають у літрову склянку, розмішують у невеликій кількості води і доводять об'єм водою до 3/4 посуду. Вміст ретельно перемішують скляною паличкою і відстоюють 10–15 хв. При цьому легкі частини ґрунту і цисти спливають на поверхню води, а основна частина ґрунту випаде в осад. Ґрунт, залитий водою, не можна залишати надовго, бо цисти, насичуючись водою, можуть знову опуститися на дно склянки. Верхній шар води з частинками, що спливли на поверхню, серед яких можуть бути й цисти картопляної нематоди, круговими рухами зливають на сито з отворами 0,1–0,2 мм, осад промивають струменем води до зникнення каламуті. Промитий осад зливають на лійку, вставлену в колбу, з попередньо зволоженою водою фільтрувальним папером. Після фільтрування папір

оглядають під бінокляром. Наявні цисти розташовуються вгорі у вузькій смужці по колу фільтра. За допомогою препарувальної голки цисти переносять у краплю води на предметне скло для визначення.

Контрольні питання для самоперевірки

1. У чому полягає фітогельмінтологічна експертиза?
2. Як виявляють паразитичних нематод?
3. Як проводять експертизу бульб, цибулин, коренеплодів та інших підземних частин рослин на виявлення цистоутворюючих нематод?
4. Як аналізують ґрунт на зараженість картопляною нематодою?
5. Опишіть методику виділення нематод із рослинного матеріалу.
6. Технологія виготовлення мікроскопічних препаратів із червоподібних та цистоутворюючих нематод.
7. Як проводять вимірювання нематод?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ № 9

ТЕМА: ГЕРБОЛОГІЧНА ЕКСПЕРТИЗА

Основні цілі:

- *ознайомитись з основами гербологічної експертизи;*
- *ознайомитись з основними методами встановлення засміченості підкарантинних матеріалів;*
- *ознайомитись, як проводиться ідентифікація та кількісна оцінка насіння бур'янів;*
- *знати, які заходи застосовуються після проведення гербологічної експертизи.*

ОСНОВИ ГЕРБОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

Гербологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах засміченості регульованими та іншими видами бур'янів в об'єктах регулювання (будь-яка рослина, ґрунт, продукти та інші організми рослинного походження) з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України.

На гербологічну експертизу середні проби, сформовані згідно з ДСТУ 3355, надходять після ентомологічної, фітопатологічної і гельмінтологічної експертиз. Гербологічна експертиза може проводитися такими методами: макроскопічним, просіюванням, відмивання ґрунту, насичених розчинів.

У системі заходів фітосанітарного карантину з охорони території України від занесення і розповсюдження карантинних об'єктів, що здійснюють органи державної служби карантину рослин, важливе значення має чітке визначення засміченості рослинної продукції та підкарантинних матеріалів насінням, плодами та вегетативними органами розмноження карантинних та інших бур'янів. Тому для ефективного контролю засміченості бур'янами вантажів і виконання вимог міжнародних стандартів фітосанітарних заходів у торгівлі фахівцям прикордонних пунктів карантину рослин (ППКР), карантинних лабораторій та інспекторам необхідно мати стандартизовані методики гербологічної експертизи підкарантинних матеріалів.

Класифікація підкарантинних матеріалів і означення методів встановлення засміченості

До підкарантинних об'єктів і матеріалів належать:

- насіння і садивний матеріал сільськогосподарських, лісових, декоративних квіткових і дикорослих рослин;
- рослини та їх частки (живці, цибулини, бульби, кореневища, щепи та ін.), продовольче, фуражне, технічне зерно, солод, шрот, комбікорми, макуха;
- рис, крупи, горіхи, арахіс, борошно та вироби з нього;
- волокно бавовни, льону та інших прядильно-волокнистих культур, вовни неминої та нечесаної;
- шкірсировина, що не пройшла хімічне оброблення;
- лікарська рослинна сировина;
- свіжі овочі, фрукти, картопля, плоди баштанних культур;
- рослинні вкладання у поштові відправлення, гербарії та колекції насіння;
- моноліти і зразки ґрунтів, органічні добрива і продукція на їх основі;

– фураж (сіно, комбікорм, підстилка і т. ін.), що використовується під час ввезення худоби з-за кордону.

МЕТОДИ ВСТАНОВЛЕННЯ ЗАСМІЧЕНОСТІ ПІДКАРАНТИННИХ МАТЕРІАЛІВ

Методи встановлення засміченості підкарантинних матеріалів насінням, плодами і вегетативними органами розмноження карантинних, потенційно небезпечних та інших видів бур'янів розподіляються на: візуальний метод, метод просіювання, метод відмивання, метод насичених розчинів.

Карантинні та потенційно небезпечні види бур'янів і рослинна продукція з якою вони поширюються і шкодять наведено в таблиці 4.

Таблиця 4

Карантинні та потенційно небезпечні види бур'янів і рослинна продукція з якою вони поширюються і шкодять

Назва бур'янів		З якою рослинною продукцією поширюється і шкодить
українська	латинська	
Соняшник війчастий	<i>Helianthus ciliaris</i> DC.	Засмічує посіви сільськогосподарських культур, необроблювані землі; надходить із зерном пшениці з Американського континенту
Соняшник каліфорнійський	<i>Helianthus californicus</i> DC.	Засмічує посіви всіх сільськогосподарських культур, пасовища, сади, виноградники; надходить із зерном пшениці з Американського континенту
Бузинник піхвовий	<i>Iva axillaris</i> Pursh.	Трапляється на полях, луках, пасовищах, узбіччях доріг, пустирях. Зростає на всіх типах ґрунтів і на солончаках; надходить із зерном кукурудзи, пшениці, насінні сої з США, Канади, Австралії
Амброзія трироздільна	<i>Ambrosia trifida</i> L.	Засмічує ярові зернові, просапні культури, кормові трави, городи, сади; надходить із зерном і насінням різних культур
Амброзія багаторічна	<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.	Засмічує зернові і просапні культури, трави, луки, пасовища, узбіччя доріг, необроблювані землі; надходить із зерном і насінням різних культур
Паслін каролінський	<i>Solanum carolinense</i> L.	Засмічує просапні і ярові зернові культури, сади, городи, луки, пасовища, узбіччя доріг; надходить із насінням різних культур
Паслін триквітковий	<i>Solanum triflorum</i> L.	Засмічує поля, сади, городи, луки, необроблювані землі; надходить частіше всього із зерном злакових культур
Паслін лінійнолистий	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	Засмічує поля, луки, пасовища; надходить із зерном пшениці зі США і Канади
Стриги	<i>Striga</i> sp.sp.	Засмічує кукурудзу, рис, сорго, просо, цукрові буряки, інші види тонконогових; надходить із зерном різних культур
Амброзія полинолиста	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	Засмічує всі польові культури, просапні і зернові, городи, сади, виноградники, луки, пасовища тощо; надходить із насінням різних культур
Паслін колючий	<i>Solanum rostratum</i> Dun.	Засмічує посіви просапних, овочевих і баштанних культур; надходить із зерном різних культур

Гірчак повзучий (рожевий)	<i>Acroptilon repens (L.)</i>	Засмічує всі посіви сільськогосподарських культур, сади, виноградники, луки, пасовища, узбіччя доріг; надходить із насінням люцерни та інших культур
Ценхрус (якірцевий)	<i>Cenchrus pauciflorus Benth.</i>	Засмічує майже всі польові культури, особливо просапні, сади, виноградники тощо; надходить із зерном злакових культур
Повитиці (всі види)	<i>Cuscuta sp.sp.</i>	Паразитує на овочевих, кормових, плодкових культурах і бур'янах; надходить із зерном і насінням різних культур
Черета двічіпірчаста	<i>Bidens bipinnata L.</i>	Зростає біля каналів, берегів річок і садів; надходить із кукурудзою зі США
Черета волосиста	<i>Bidens pilosa L.</i>	Зростає біля каналів, берегів річок, садів; надходить із кукурудзою і соєю зі США і Аргентини
Діюдія валькувата	<i>Diodia terres Walt.</i>	Засмічує всі польові сільськогосподарські культури, дає перевагу сухим, піщаним ґрунтам; надходить із зерном і насінням різних культур
Сіціос кутастий	<i>Sicyos angulatus L.</i>	Сади, пустирі, узбіччя доріг; надходить із зерном кукурудзи зі США
Сорго алепське (гумай)	<i>Sorghum halepense (L.)</i>	Засмічує польові, овочеві культури, сади, виноградники, узбіччя доріг, необроблювані землі; надходить з насінням зернобобових, люцерни і овочевих культур
Іпомея плющоподібна	<i>Ipomoea hederacea (L.)</i>	Засмічує польові культури, сади, пустирі; надходить з кукурудзою, соєю, соєвим шротом зі США, Аргентини, Бразилії, із зерном рису з Південно-Східної Азії
Іпомея лакуноза	<i>Ipomoea lacunosa L.</i>	Засмічує польові культури, сади, пустирі; надходить із кукурудзою, соєю, соєвим шротом зі США, Аргентини, Бразилії; із зерном рису з Південно-Східної Азії
Плоскуха рисова	<i>Echinochloa oryzoides (Ard.)</i>	Трапляється на рисових полях; надходить із зерном рису та інших культур
Молочай зубчастий	<i>Euphorbia dentata Michx.</i>	Трапляється по портових місцях, залізничних коліях, необроблюваних землях; надходить із насінням пшениці зі США
Гірчак пенсільванський	<i>Polygonum pensylvanicum L.</i>	Засмічує польові культури, сади, виноградники, необроблювані землі; надходить із зерном пшениці зі США і Канади
Райманія розсічена	<i>Raimania laciniata (Hili.) Rose.</i>	Засмічує посіви пшениці на Американському континенті, сади, виноградники; надходить із зерном і насінням різних культур
Сіда колюча	<i>Sida spinosa L.</i>	Засмічує сорго, кукурудзу, інші просапні культури; надходить із зерном і насінням різних культур

Підготовка проб. На гербологічну експертизу середні проби надходять після ентомологічної, мікологічної і фітогельмінтологічної експертиз. Гербологу передається окремо проба рослинного чи іншого матеріалу і в окремому пакуванні залишки сходів із сит у разі просіювання чи спливів під час флотації від попередніх експертиз.

Під час проведення експертизи дрібних партій рослинної продукції (вагою до 3 кг), що використовують для науково-дослідних робіт або для колекції з

ботанічних садів, проводиться повний (100 %) аналіз всього насіння, плодів, бур'янів з кожної торбинки чи пакета (якщо пакетів з однорідним насінням не більше 25).

Експертиза прядильно-волокнистих матеріалів, лікарської сировини, сіна, соломи, посадкового матеріалу проводиться візуальним методом. Під час проведення експертизи гербаріїв необхідно оглядати кожний гербарний лист.

Метод просіювання. Метод просіювання середньої проби через комплекти сит у лабораторії та огляду сходу і проходу з сит після просіювання сипучих матеріалів (зерна, насіння, змітки, ґрунт тощо).

Апаратура та матеріали: комплект лабораторних сит з видовженими та округлими отворами; пристрій механізований для просіювання зерна та насіння; лупи настільні і налобні зі збільшенням не менше ніж у чотири рази; біноклярна лупа (бінокляр); пробірки, пакети, карпологічна колекція бур'янів.

Після загального огляду середню пробу висипають у комплект сит або в пристрій механізований. Просіювання проводять вручну чи в механізованому пристрої поздовжньо-зворотними рухами за направленням довжини отворів у решітці протягом 3 хв із загальною кількістю коливань до 180.

Сита підбирають таким чином, щоб на першому залишалось насіння культури, що аналізується, а на другому – домішки середнього розміру, в тому числі насіння амброзії, соняшнику, пасльону, а на піддон просіювались найдрібніші домішки, як наприклад, насіння повитиць і стриг.

Після просіювання схід з кожного сита окремо висипають на аналізну дошку, розрівнюють тонким шаром і розбирають шпателем, оглядаючи через лупу. Виявлене насіння карантинних та потенційно небезпечних бур'янів, а також раніше отримані залишки з попередніх експертиз, складають окремо за видами в пакети або пробірки.

Прохід із сит при невеликій кількості висипають у чашки Петрі і переглядають через лупу або біноклярну лупу. Виявлене дрібне насіння повитиць, стриг чи інших бур'янів вибирають у пробірки для подальшої ідентифікації. Використані сита після кожного аналізу очищають від пилу та бруду.

Метод відмивання ґрунту. Цей метод полягає в промиванні середньої проби ґрунту чи іншого матеріалу на ситах під струменем води.

Апаратура та матеріали: комплект лабораторних сит з решітного полотна (шовкового) з розміром отворів 0,56 мм, 0,25 мм, 0,1 мм, пристрій механізований для просіювання зерна та насіння, дошка аналізна, лотки, кювети, лупи настільні, або налобні, біноклярний мікроскоп, чашки Петрі, шпатель, пінцети, фільтрувальний папір.

Відібрану середню пробу висипають в одне або декілька сит і занурюють у таз з водою на 1/2–2/3 висоти, і тримають до тих пір, поки ґрунт не розмокне.

Сито тримають над раковиною і промивають легким струменем води, перемішуючи м'яким пензликом. Промивання виконують доти, поки з-під сита не почне текти прозора вода. Струмінь води повинен бути з мінімальним тиском, щоб уникнути розбризкування і можливого викидання насіння з сита.

Органічні і неорганічні залишки з сита переносять на фільтрувальний папір, просушують, просіюють через комплекти сит з отворами 3,5–0,1 мм.

Кожну фракцію із сит оглядають через лупу, а дрібні домішки під бінокелем. Все виділене насіння бур'янів вибирають для подальшої ідентифікації. Цей метод не зовсім зручний для промивання суглинистих і піщаних ґрунтів. На ситі залишаються мінеральні частинки, а серед них дуже важко виділити насіння повитиць і стриг. У цьому випадку краще користуватись методом насичених розчинів.

Метод насичених розчинів. Метод насичених розчинів оснований на різниці питомої ваги мінеральної ($2,4 \text{ кг/м}^3$) і органічної, в тому числі насіння – ($1,4 \text{ кг/м}^3$) частини.

Апаратура, матеріали, реактиви: біетіловий ефір, хлористий цинк, поташ, комплект лабораторних сит з решітного полотна (шовкового) з розміром отворів 0,56 мм, 0,25 мм, 0,1 мм, пристрій механізований для просіювання зерна та насіння, дошка аналізу, лотки, кювети, лупи настільні, або налобні, бінокельний мікроскоп, чашки Петрі, шпатель, пінцети, фільтрувальний папір. Насичений розчин готують із суміші бромформу і діетилового ефіру по 4 частини, з об'ємом з додаванням води так, щоб питома вага становила 1,7; або використовують розчин поташу з питомою вагою 1,57 (530 г на 1 л води) або хлористого цинку з питомою вагою 1,96 (700 на 1 л води).

Середню пробу ґрунту висипають в один з вищенаведених розчинів, обережно збовтують і перемішують скляною паличкою. При цьому мінеральні частинки осідають на дні, а органічні з насінням бур'янів спливають на поверхню або знаходяться в завислому стані.

Розчин разом з насінням проціджують через паперовий фільтр і ретельно промивають чистою водою. Виділене насіння бур'янів обсушують на фільтрувальному папері і проводять ідентифікацію.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНА ОЦІНКА ВИЯВЛЕНОГО НАСІННЯ БУР'ЯНІВ

Все виділене різними методами насіння бур'янів з однієї партії підкарантинного матеріалу групують за родинними і визначають, користуючись карпоботанічною колекцією, визначниками, атласами чи іншою спеціальною літературою. Щоб краще розглянути структуру поверхні насінини і форму насінневого рубчика, краще користуватись бінокелем. У разі визначення насінин бур'янів основними характерними ознаками є обрис і форма насінини, плоду, структура поверхні, колір і форма насінневого рубчика. Розміри і колір насінини – ознаки нестійкі. Опушеність насінин – ознака стійка, але в сільськогосподарській продукції волоски, шипи та інші вирости стираються.

Деформоване, недозріле чи інше насіння, яке втратило основні характерні зовнішні ознаки родини, розміщують у пробірці і кип'ятять над спиртівкою до набрякання оболонки. Набрякле насіння висипають на фільтрувальний папір, обсушують, препарувальною голкою переносять на предметне скло і під бінокелем за допомогою скальпеля чи іншої голки виймають зародок.

Зародок повитиць не диференційований на сім'ядолі і корінець, а являє собою спіральну згорнуту жовту нитку. У разі наявності такого зародка насіння буде належати до роду повитиць (*Cuscuta*).

Ідентифіковане і підраховане за видами насіння бур'янів забезпечують етикеткою і зберігають в лабораторії як зразок-документ.

У разі виявлення в середній пробі карантинних та потенційно небезпечних видів бур'янів у протоколі експертизи в розділі «Ботанічні об'єкти» зазначають їхню кількість за видами, який оформлюють як окремий документ і зберігають у ППКР чи лабораторії. Кількість насіння карантинних і потенційно небезпечних бур'янів у середній пробі в протоколі і свідоцтві експертизи зазначають у перерахунку на 1 кг підкарантинної рослинної продукції.

Виявлене насіння некарантинних видів бур'янів заносять у протокол експертизи з вказівкою виду без обліку їх кількості.

ЗАХОДИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ГЕРБОЛОГІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ

На підставі результатів карантинної експертизи, отриманих будь-яким із вищезазначених методів і оформленого свідоцтва карантинної експертизи відповідно до Закону України «Про карантин рослин» (статті 7, 11, 13) та Статуту карантинної служби приймають рішення щодо засміченості карантинними бур'янами партій рослинної продукції; проведення їх до очищення чи способів перероблення, знищення чи негайного повернення відправникові, не допускаючи на територію України чи в зони України вільні від карантинних бур'янів.

Рішення державних органів карантину рослин України на її території обов'язкові для негайного виконання всіма організаціями, установами, господарствами та іншими суб'єктами господарчої чи підприємницької діяльності.

Контрольні питання для самоперевірки

1. Яка мета гербологічної експертизи?
2. Що відноситься до підкарантинних об'єктів і матеріалів гербологічної експертизи?
3. Які є методи встановлення засміченості підкарантинних матеріалів?
4. Як проводять ідентифікацію виявленого насіння бур'янів?
5. Як проводять кількісну оцінку виявленого насіння бур'янів?
6. Які заходи застосовують за результатами гербологічної експертизи?

КАТАЛОГ РЕСУРСІВ

1. Бублик Л. І., Васечко Г. І., Васильєв В. П. Довідник із захисту рослин. Київ : Урожай, 1999. 293 с.
2. Веселовський І. В., Манько Ю. П., Танчик С. П. Бур'яни та заходи боротьби з ними. Київ : Учбово-методичний центр Мінагропрому України, 1998. 184 с.
3. Колодійчук В. Д. Практикум із сільськогосподарської фітопатології. Київ : Центр учбової літератури, 2013. 232 с.
4. Литвинов Б. М., Євтушенко М. Д. Сільськогосподарська ентомологія : Підручник. Київ : Вища освіта, 2005. 511 с.
5. Марков І. Л. Практикум із сільськогосподарської фітопатології : Посібник. Київ : Урожай, 1998. 272 с.
6. Марютін Ф. М., Білик М. О. Фітопатологія : Навчальний посібник. Харків : Еспада, 2008. 552 с.
7. Мовчан О. М., Устінов І. Д., Сикало О. О. Карантинні шкідливі організми. К.: Світ, 2000. 197 с.
8. Пересипкін В. Ф. Сільськогосподарська фітопатологія. Київ : Аграрна освіта, 2000. 415 с.
9. Положенець В. М. Патогенез хвороб рослин : Навчальний посібник. Житомир : ПП «Рута», 2015. 216 с.
10. Рубан М. Б., Гадзало Я. М. Сільськогосподарська ентомологія: Підручник. Київ : Арістей, 2007. 520 с.
11. Рубан М. Б., Гадзало Я. М. Практикум із сільськогосподарської ентомології : Навчальний посібник. Київ : Арістей, 2009. 472 с.
12. Устінов І. Д., Мовчан Ж. Д., Кудіна Ж. Д. Карантин рослин : карантинні шкідники : Посібник. К. : ІРІС, 1995. Ч. 1. 416 с.