

## МЕТОДОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ КАРТОФЕЛЬНЫХ ГЛОБОДЕР В ПОЧВЕ

**А.А. ШЕСТЕПЕРОВ**

доктор биологических наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт гельминтологии*

*им. К.И. Скрябина,*

*117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: [vigis@ncport.ru](mailto:vigis@ncport.ru)*

**Е.В. БУТОВ, К.Б. БУТОВА**

*Российский государственный аграрный заочный университет*

(Одобрены на заседании нематодной комиссии при отделении защиты растений РАСХН, 25 января 2012 г., протокол № 1)

Рекомендации посвящены методологическим вопросам определения плотности популяции картофельных глободер в почве и оценке биологической эффективности мероприятий в борьбе с ЗКН (испытание нематодицидов, нематодоустойчивых сортов и гибридов, противонематодных звеньев севооборота, определения вредоносности ЗКН и экономического порога вредоносности и т. д.).

Отбор первичных образцов. Размер опытных делянок может колебаться от 10 до 100 м<sup>2</sup>. В связи с тем, что для ЗКН характерно неравномерное распределение в пространстве (очаговое в зависимости от борозд, от предшественников, выращивания нематодоустойчивых сортов), важно предварительно (лучше осенью) провести картирование посадок картофеля, запланированных под опыт, на зараженность цистами, яйцами, личинками ЗКН. После отбраковки делянок со слабой и очень сильной зараженностью ЗКН опытные делянки обязательно маркируют кольщиками. При учете урожайности картофеля оптимальный размер делянок 25–45 м<sup>2</sup> (В.Ф. Моисейченко и др., 1994).

Первичные образцы (выемки) отбирают с каждого квадратного метра делянки, за исключением защиток (но не менее 20) на глубину пахотного слоя. Размеры выемок зависят от используемых почвоотборников. Для объективной оценки плотности популяций ЗКН на обследуемых делянках необходимо во всех точках отбирать одинаковые по диаметру, высоте и уплотненности выемки при помощи специальных буров или почвоотборников. В случае их отсутствия (а это снижает точность опыта) можно использовать садовый совок на глубину пахотного слоя (но не ложку!). Объем первичного почвенного образца 50–60 см<sup>3</sup>. Первичные образцы высыпают в одно ведро или прочный полиэтиленовый мешок. Желательно отбирать первичные образцы по зигзагу.

Получение среднего почвенного образца. Первичные образцы объединяют в смешанный образец, который переносят на специально расчищенную плотную площадку размером 1–2 м<sup>2</sup> или кусок фанеры и тщательно перемешивают совком. После перемешивания почву разравнивают в форме диска или квадрата, затем двумя взаимно перпендикулярными линиями делят на 4 части. Две противоположные части отбрасывают, оставшиеся смешивают, с ними проводят ту же операцию, ее повторяют до получения одного или трех средних образцов объемом 0,7–0,9 дм<sup>3</sup> почвы каждый для фитогельминтологического и агрохимического анализов, а также для биотеста. В плотняные (в крайнем случае полиэтиленовые) мешочки с отобранным почвенным средним образцом вкладывают этикетки из пластмассы или плотной вошеной бумаги, на которых дважды пишут необходимую информацию. Образцы, собранные с опытных делянок, упаковывают в один полиэтиленовый или бумажный мешок и карандашом заполняют учетную карточку. Мешки упаковывают в плотные деревянные ящики, выстланные внутри бумагой, чтобы почва не просыпалась при транспортировании. ЗКН и БКН – карантинные

объекты, поэтому необходимо соблюдать карантинные правила при транспортировке образцов.

Средние почвенные образцы, особенно влажные, доставляют в лабораторию и срочно доводят почву до воздушно-сухого состояния перемешиванием и высушиванием на бумаге (чем толще слой газет, тем быстрее высохнет образец) в течение нескольких дней при комнатной температуре. Для удаления растительных остатков, камней, крупных комков и получения репрезентативных проб почву после высушивания просеивают через почвенное сито с ячейками размером 3–4 мм. Высушенные средние почвенные образцы хранят в полотняных или полиэтиленовых мешочках (открытых) на стеллажах в сухом помещении.

Отбор почвенных проб. Информацию с этикетки среднего почвенного образца записывают в специальный журнал. Средний почвенный образец высыпают на лист бумаги (газеты), перемешивают, разравнивают в виде квадрата и делят на 16–25 квадратов. С каждого квадрата шпателем или предметным стеклом берут немного почвы, стараясь захватить всю ширину слоя, высыпают в конический стакан (стопка) объемом 100 см<sup>3</sup>. После того, как насыпали почву в стакан с верхом, стучат стаканчиком о стол 3 раза и добавляют почвы. Еще раз стучат стаканчиком, затем предметным стеклом снимают лишнюю почву сверху. От каждого среднего образца отбирают описанным методом не менее 4 почвенных проб. Оставшуюся почву с этикеткой сохраняют до завершения фитогельминтологических анализов и используют для проведения биотеста.

Фитогельминтологический анализ почвенных проб. Существуют несколько способов анализов на цисты глободер: метод бумажных полос, промывки, флотационно-вороночный, извлечение цист на приборе Фенуика или цистовыделителях. Прежде чем приступить к выделению и подсчету цист необходимо провести стандартизацию используемого метода.

Предварительно из почвы с приусадебных участков с высокой численностью цист ЗКН отбирают подряд по 100 цист в 4 повторностях. После этого берут подсушенную *незараженную* ЗКН почву, отмеряют 100 см<sup>3</sup>, высыпают цисты в почвенную пробу, тщательно перемешивают и проводят фитогельминтологический анализ. В случае извлечения цист цистовыделителем стандартизируют каждую колбу. Результаты фитогельминтологического анализа 4 почвенных проб покажут эффективность применяемого метода и помогут сделать выводы о возможности его использования и оборудования для определения плотности популяции ЗКН.

Подсчет цист. Лучше всего проводить на бумажных, нейлоновых фильтрах. Желательно фильтр просматривать сразу. Если фильтр высохнет, то шарообразные цисты скатываются с него. Подсчет всех цист (без исключения) проводят по кругу фильтра, потом считают цисты в центре фильтра, проверяя препаративной иглой наличие цист в органике.

При подсчете цист, яиц и личинок лучше всего использовать счетчики (одинадцатиклавишный для подсчета количества клеток крови или для подсчета колоний микроорганизмов).

Определение численности яиц и личинок ЗКН в цистах. При небольшом числе цист их разрывают и раздавливают в воде на предметных стеклах с лунками вручную препаративными иглами. Воду вместе с яйцами и личинками отсасывают пипеткой. Вновь добавляют воду и так повторяют несколько раз. Потом подсчитывают число яиц и личинок в суспензии.

Можно также раздавить цисты между двумя предметными стеклами. Раздавленный образец смывается со стекла в градуированный сосуд, разбавляется водой до определенного объема. Взвеси размешивают в течение 30 с с магнитной мешалкой. После этого шприцем с широким концом отбирают четыре–пять раз по 1 мл суспензии и подсчитывают число яиц и личинок в счетной камере или на предметных стеклах. Определяют их среднюю численность в 1 мл суспензии и делают пересчет на весь объем суспензии, что соответствует числу яиц и личинок в 100 см<sup>3</sup> почвы.

По нашим данным, этот метод подсчета яиц и личинок ЗКН имеет относительную ошибку 25–60 % от средней численности нематод. Поэтому мы разработали другой метод определения плотности популяций ЗКН в почве с помощью градуированных пробирок и пипетки.

Подсчет яиц и личинок. После подсчета отбирают 50 (40) (если их мало, то все цисты) с помощью препаровальной иглы или бамбуковой расщепленной заостренной палочки. Цисты переносят в каплю воды на предметное стекло с лункой, подсчитывают 50 цист, лишние цисты и мусор отодвигают вправо от лунки, цисты – влево на край лунки. Все цисты нужно раздавить металлической иглой, вычистить из оболочек цист содержимое – яйца и личинки.

Предварительно проводят градуировку энтомологической пробирки и глазной пипетки с вытянутым концом, диаметр которой должен быть больше 1 мм. Для этого набирают в пипетку воды и закапывают в пробирку 5 капель. Эту операцию проводят еще 8 раз. На пробирке пластырем отмечают уровень 50 и 100 капель.

Перед подсчетом нужно подготовить предметное стекло с лункой и два плоских предметных стекла. В стекло с лункой помещают несколько капель воды, затем пипеткой добавляют несколько капель взвеси с раздавленными цистами. В градуированную пробирку переносят пипеткой содержимое из лунки. Потом несколькими каплями чистой воды смывают пипеткой оставшиеся яйца и личинки в пробирку. Для контроля стекла просматривают под биноклем на наличие яиц.

В пробирку добавляют воду до отметки и взбалтывают с помощью пузырьков воздуха из пипетки. Суспензию сразу же забирают пипеткой, кончик которой должен находиться на середине расстояния между верхом жидкости и дном. На предметное стекло капают (пипетка перпендикулярна стеклу) три капли, потом сливают оставшуюся суспензию в пробирку, взбалтывают и отбирают из ее середины суспензию нематод, капают на стекло три капли, затем еще 4 капли ( $3к + 3к + 4к = 10к$ ). Предварительно на тонкой полиэтиленовой пленке расчерчивают авторучкой сетку (2 x 2 мм). Ее помещают на стекло бинокляра, накрывают предметным стеклом с каплями суспензии нематод и подсчитывают под увеличением 6 x 7 яйца и личинки, используют счетчик. Следует учитывать также личинок, поврежденных во время выделения из цист; пустые оболочки яиц не подсчитывают. Если число яиц и личинок в каплях на предметных стеклах значительно отличается (больше 20 %), то подсчет яиц и личинок в оставшейся суспензии в пробирке повторяют.

В случае, когда в  $100 \text{ см}^3$  почвы меньше 100 цист, можно отбирать 40 цист, соответственно, пробирку градуируют на 40 капель.

После проведения фитогельминтологического анализа всех почвенных проб проводят статистическую обработку и определяют достоверность различий между средними арифметическими исследуемых выборок (Б.А. Доспехов, 1985).

Методы определения жизнеспособности личинок ЗКН. Для решения вопроса о снятии карантина с поля или индивидуального участка, а также определения биологической эффективности мероприятия, примененного в борьбе с цистообразующими нематодами, необходимо знать не только численность яиц и личинок, но и запас жизнеспособных нематод в почве. Оценка жизнеспособности яиц и личинок, находящихся в цистах, является довольно трудной. Для этого их раздавливают, слегка нажимая на покровное стекло. Яйца и личинки, выделившиеся из цист, просматривают под микроскопом. Жизнеспособные личинки распрямляются, имеют нормальный тургор тела, сквозь кутикулу у них хорошо просматриваются внутренние органы. Мертвые личинки имеют изогнутое, с резкими перегибами тело, для них характерна более резкая зернистость пищевода и вакуолизация внутренностей. Однако эти признаки обнаруживаются спустя лишь продолжительное время после гибели

ли. Почти невозможно различить умирающих, здоровых личинок и личинок, находящихся в состоянии ангидробиоза.

Окрашивание личинок ЗКН. Для определения жизнеспособности личинок ЗКН используют окрашивание раствором малахитовой зелени. Цисты, хранившиеся в высушенном состоянии в почвенных образцах длительное время, следует в течение одних или более суток выдерживать в воде (чем больше времени цисты были высушены, тем продолжительнее должна быть экспозиция). Часовые или предметные стекла с лунками, наполненные водой и цистами, хранят в закрытых чашках Петри на увлажненной фильтровальной бумаге.

На предметное стекло в каплю *дистиллированной* воды помещают цисту, раздавливают препаровальной иглой и рядом с ней наносят каплю 0,05%-ного раствора малахитовой зелени (50 мг на 100 мл дистиллированной воды). Затем иглой капли смешивают и оставляют на 5–10 мин. На одно стекло можно помещать несколько капель воды с цистами, но при этом нужно нанести еще одну каплю воды без цист, в которой после каждого раздавливания ополаскивают иголку и тщательно ее вытирают, чтобы предотвратить возможность перенесения личинок из одной капли в другую.

Для окрашивания мертвых личинок можно использовать также раствор бриллиантового зеленого спиртовой 1% («зеленка» аптечная). Экспозиция окрашивания увеличивается до 20–30 мин. После этого добавляют несколько капель дистиллированной воды, осторожно отсасывают пипеткой раствор без личинок и яиц. Эту операцию повторяют до тех пор пока раствор будет почти прозрачным.

Стекло устанавливают на предметный столик светового микроскопа, каплю накрывают покровным стеклом и просматривают каждую каплю в отдельности. Мертвые личинки окрашиваются интенсивно в голубовато-зеленоватый цвет, а живые не окрашиваются совсем или же окраска их значительно отличается от мертвых по интенсивности.

В связи с тем, что оболочки яиц окрашиваются в темно-зеленый цвет, определить жизнеспособность личинок внутри яиц не представляется возможным. Поэтому этот метод определяет жизнеспособность личинок ЗКН в цистах.

Использование растений-индикаторов для определения инвазированности почвы жизнеспособными яйцами и личинками картофельной нематоды имеет преимущество перед методами окрашивания и микроскопической оценки в виду своей простоты и достоверности.

При решении вопроса о снятии карантина с участка поля проводят отбор образцов почвы по вышеуказанной методике и после перемешивания первичных образцов отбирают два средних образца объемом по 1 л для последующего анализа с помощью растений-индикаторов. Отбор образцов проводят осенью после перепашки и маркируют их.

В вазонах или темных пластиковых мешках с исследуемой почвой (1–2 кг) выращивают одно–два растения картофеля восприимчивых сортов (Синеглазка, Удача, Детскосельский, Приекульский ранний и др.), можно использовать пластмассовые или гончарные горшки (7–10 см в диаметре), в которые насыпают почву и высаживают клубни восприимчивых сортов картофеля. Каждый горшок, вазон или мешок должны быть маркированы, иметь две пластмассовые или деревянные этикетки с шифром или с указанием месторасположения отобранного образца. Биотест проводят с декабря.

Контролем должны служить два–три вазона с почвой, инвазированной жизнеспособными личинками. Через 40–60 сут (в зависимости от температуры) контрольные растения осторожно выкапывают, отмытые от почвы корни исследуют с помощью бинокулярной лупы на темном фоне. Если на контрольных растениях хорошо видны белые самки, то анализируют корневую систему растений-индикаторов. В связи с наибольшей вероятностью обнаружения самок, тщательно анализируют всю корневую систему. В случае от-

сутствия на корнях самок картофельной нематоды почву образцов анализируют на наличие цист.

Указанный метод более эффективен по сравнению с другими, поскольку выявляет жизнеспособные яйца и личинки даже при очень низкой плотности популяции глободер (менее одной цисты на 0,5 л).

**Биотест** или метод растений-индикаторов дает возможность получить более объективные данные о жизнеспособности ЗКН в почве в опытах по испытанию высокоэффективных методов в борьбе с ней.

При получении среднего почвенного образца дополнительно формируют еще один или два средних образца для агрохимического анализа и биотеста.

Биотест проводят в специальной теплице или, в крайнем случае, на подоконниках в инспекции в гончарных, пластмассовых, пластиковых непрозрачных горшках, вазах, сосудах объемом 400–600 см<sup>3</sup>. На дно горшка (сосуда) насыпают торф толщиной 1–1,5 см, потом заполняют испытываемой почвой (объем почвы во всех повторностях, вариантах одинаков). Сверху почвы насыпают слой торфа или стерильного песка (более 2 см). Каждый сосуд должен быть маркирован и иметь две пластиковых этикетки. Желательно в журнале описать размещение опытных сосудов.

Среди испытываемых сосудов предусматривают размещение нескольких (более 5) контрольных сосудов. Горшки (сосуды) заполняют смесью торфа с зараженной ЗКН почвой (1 : 1). Предварительно определяют плотность популяции ЗКН в сильно зараженной почве (на 100 куб. см) и засыпают в контрольные сосуды определенный объем почвы: в сосуде должно быть не менее 1 тыс. яиц и личинок ЗКН.

В сосуды (горшки) высаживают по одному калиброванному клубню восприимчивого сорта картофеля. Клубни с наклюнувшимися ростками можно высаживать с конца ноября до середины марта. В месяцы с коротким световым днем желательно (но необязательно) использовать дополнительное освещение. При поддержании температуры в пределах 12–22 °С и оптимальной водообеспеченности (60–70 % от полной влагоемкости) результаты биотеста можно оценить уже через 7–9 нед после выявления всходов, когда на поверхности земляного кома контрольных горшков (экспериментально зараженных ЗКН) будут хорошо видны белые, желтые самки и цисты картофельных глободер.

Для этого сосуды берут со стеллажа, переворачивают и, осторожно постукивая о край стола, выбивают из сосуда ком почвы и с помощью лупы просматривают корневую систему с целью выявления и подсчета ЗКН. Если клубень загнил, растение погибло, на поверхности кома нет корней, такие сосуды бракуют и не учитывают. На поверхности земляного кома контрольных и других сосудов подсчитывают всех белых, желтых, светло-коричневых самок и цисты, причем число их до 100 устанавливают в пределах десятка (5, 10, 20, 30 ...), а при наличии более 100 самок и цист результат обозначают как > 100. За основу оценки жизнеспособности личинок в почве принимается самая высокая численность самок и цист из 3–5 повторностей (сосудов). По результатам наших исследований установлено, что если на коме дерново-подзолистой песчаной почвы (объем 0,5 л) обнаружено 100 самок и цист (контроль), то в 100 см<sup>3</sup> почвы было более 120 жизнеспособных личинок.

Этот биотест позволяет получить достаточно точный для практических выводов количественный результат при заражении ЗКН почвы в пределах от 5 до 1000 яиц и личинок на сосуд. Популяции больших размеров такой оценке не поддаются.

Все работы с растениями-индикаторами проводят при строгом соблюдении карантинных правил, исключающих распространение золотистой картофельной нематоды.