

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ  
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**  
**щодо визначення та підрахунку різних видів**  
**збудників сажкових хвороб**

**Київ – 2024**

Рекомендації розглянуті, затверджені та прийняті на засіданні Науково-методичної ради Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 3 від 29.05.2024 р.)

**Розробники:**

Чайковський В.М., Челомбітко А.Ф., Башинська О.В., Лихач Є.А., Галюк В.П., Василенко К.С., Суворова А.В., Андрієнко О.Я., Гада І.Є., Ющук Є.Т., Журавчак Т.М., Бабій В.І., Мілева С.О., Авдєєва О.А.

**Рецензенти:**

Артюх М.М., кандидат сільськогосподарських наук, завідувач лабораторії фізіології винограду ННЦ «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є.Таїрова»;

Голосна Л.М., кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник лабораторії фітопатології Інституту захисту рослин НААН України;

Доля М.М., доктор сільськогосподарських наук, професор, завідувач кафедри ентомології, інтегрованого захисту та карантину рослин НУБІП України;

Ключевич М.М., доктор сільськогосподарських наук, професор, в.о. зав.кафедри здоров'я природи та якості харчових ресурсів Державного університету «Житомирська політехніка»;

Косилович Г.О., кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики, селекції та захисту рослин Львівського національного університету природокористування;

Піковський М.Й. - доктор сільськогосподарських наук, доцент кафедри фітопатології ім. В.Ф. Пересипкіна НУБІП України.

**Методичні рекомендації щодо визначення та підрахунку спор різних видів збудників сажкових хвороб / [Чайковський В.М., Челомбітко А.Ф., Башинська О.В., Лихач Є.А., Галюк В.П., Василенко К.С., Суворова А.В., Андрієнко О.Я., Гада І.Є., Ющук Є.Т., Журавчак Т.М., Бабій В.І., Мілева С.О., Авдєєва О.А.]. – Київ: «Державна служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів», 2024 рік – 23 с.**

Методичні рекомендації призначені для проведення фітосанітарної експертизи (аналізів) об'єктів регулювання відповідно до вимог Закону України «Про карантин рослин» та на виконання фітосанітарних вимог країн-імпортерів, з метою визначення виду, вмісту сажкових зерен у зразку та зараженості спорами однієї зернини. Для впровадження єдиного підходу щодо проведення фітосанітарної експертизи (аналізу) об'єктів регулювання в державних фітосанітарних лабораторіях, які акредитовані відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» з урахуванням національних, регіональних або міжнародних стандартів та нормативних документів.

© «Держпродспоживслужба», 2024

## Зміст

Вступ.....	4
Терміни та визначення.....	5
1. Призначення, сфера застосування та відповідальність.....	7
2. Необхідне обладнання.....	7
3. Підготовка до проведення фітосанітарної експертизи (аналізу).	8
3.1. Підготовка робочого місця.....	8
3.2. Стерилізація посуду та інструментів.....	8
3.3. Вимоги щодо безпеки під час проведення фітосанітарної експертизи (аналізу).....	8
3.4. Підготовка зразків об'єктів регулювання.....	8
4. Опис та хід проведення фітосанітарної експертизи (аналізу)....	9
4.1. Визначення та ідентифікація грибних хвороб у зразку.....	9
4.2. Визначення зараженості спорами сажки шляхом промивання через сита.....	10
4.3. Визначення вмісту сажкових зерен у зразку.....	11
4.4. Визначення зараженості спорами сажки однієї зернини.....	12
Додатки.....	15
Додаток А. Морфологічна ідентифікація сажки.....	15
Додаток Б. Симптоми захворювання та вигляд теліоспор різних видів сажки.....	16
Додаток В. Приготування тимчасових та постійних мікропрепаратів....	20
Додаток Г. Поводження зі зразками.....	21
Додаток Д. Схема аналізування зерна на вміст домішок.....	22
Додаток Е. Перелік лабораторних сит та тривалість просіювання.....	22
Література.....	23

## ВСТУП

Зернові культури – це основа сільськогосподарського виробництва. Зерно і продукти їх переробки мають різнобічне застосування, зокрема: продовольче, кормове та технічне. Зерно є основним джерелом харчування людини і кормом для тварин.

Також Україна – один із найбільших у світі експортерів зерна. Експорт української продукції – це необхідна та важлива складова агровиробництва. Згідно з даними Продовольчої програми ООН, до повномасштабної військової агресії Російської Федерації Україна постачала 42 % соняшникової олії, що продається на світовому ринку, 16 % кукурудзи та 9 % пшениці.

Тому питанню виробництва зернової продукції в нашій країні приділяється важливе значення. Членство України у Світовій організації торгівлі та вихід національної продукції, зокрема харчової, на зовнішні ринки потребує розроблення нових підходів до гарантування її безпечності та якості.

Україна є членом ряду міжнародних організацій, які регулюють питання карантину і захисту рослин, що надає можливість здійснювати міжнародну торгівлю об'єктами регулювання за загальновизнаними світовими правилами.

Разом з цим кожна країна світу має суверенне право захищати свою територію від занесення та інтродукції карантинних організмів та визначати специфічні вимоги для імпорту рослин та рослинних продуктів, в тому числі і зерна.

Членство України в міжнародних організаціях зобов'язує нашу країну виконувати фітосанітарні вимоги, які виставляють певні країни до української продукції і в першу чергу до зерна. Зокрема, з метою виконання фітосанітарних вимог Турецької Республіки державні фітосанітарні лабораторії повинні проводити як виявлення та ідентифікацію збудників сажкових хвороб, так і підраховувати чисельність сажкових зерен, встановлюючи кількісний показник забруднення вантажів зерна пшениці спорами різних сажкових хвороб, таких як *Tilletia indica*, *Tilletia controversa*, *Tilletia caries* і *Tilletia foetida*. Оскільки при перевищенні певного відсоткового показника наявності сажкових зерен ввезення таких вантажів до цієї країни буде заборонено.

Серед багаточисельних хвороб зернових культур, сажкові хвороби є найбільш шкідливими. Вони спричиняють прямі втрати врожаю і проявляють опосередкований негативний вплив на ріст, розвиток і продуктивність рослин (зменшення довжини колоса, кількості зерен у колосі, схожості та маси зерна). При сильному ураженні зерна погіршуються його товарні, хлібопекарські і біохімічні показники якості (борошно темніє, зерно має неприємний запах, зменшується вміст цукру, крохмалю, тіаміну тощо). Ослаблені рослини втрачають генетичну стійкість до інших патогенів, а також до екстремальних гідротермічних умов у період вегетації рослин, що призводить до значних втрат зерна.

## Терміни та визначення

**Зараженість зерна хворобами** – це наявність на поверхні чи всередині або у міжнасінневому просторі життєздатних патогенів, які спричинили або здатні за сприятливих умов спричинити ураження зернини хворобами з характерними симптомами.

**Зразок** – частина середньої проби, відібрана від об'єкта регулювання та призначена для проведення фітосанітарної експертизи (аналізів).

**Зразок-документ** – шкідливі організми або заражені об'єкти регулювання, відібрані в ході інспектування або фітосанітарної експертизи (аналізів), які засвідчують фітосанітарний стан об'єкта регулювання.

**Камера Горяєва** – пристрій, призначений для підрахунку кількості клітин в заданому обсязі рідини. Складається з товстого предметного скла, що має прямокутне заглиблення (камеру) з нанесеною мікроскопічною сіткою та тонкого покривного скла.

**Карантинний організм** – вид шкідливого організму, який у разі занесення або обмеженого поширення на території України може завдати значної шкоди рослинам і рослинним продуктам.

**Контамінація** – зараження чужорідним біологічним матеріалом (вірусами, бактеріями, грибами тощо).

**Макроскопічний метод** – метод, який використовують для візуального виявлення захворювання у випадку зовнішнього оглядання рослинної продукції, середньої проби, продуктів переробки виробів із рослин, а також сажкових утворів, спор, склероціїв у насінні за явними ознаками.

**Мікологічна експертиза (аналіз)** – дослідження рослинного матеріалу для встановлення зараженості його фітопатогенними організмами (грибами).

**Регульований шкідливий організм** – карантинний організм або регульований некарантинний шкідливий організм.

**Регульований некарантинний шкідливий організм** – некарантинний шкідливий організм, наявність якого в насінневому та садивному матеріалі справляє економічно неприйнятний вплив на очікуване використання цих рослин і внаслідок чого підлягає регулюванню.

**Сажка** – руйнування ураженої тканини і перетворення її в пил.

**Сажкове зерно** – зерно, у якого забруднена борідка, борозенка або частини поверхні спорами сажки.

**Спори** – мікроскопічні одноклітинні, двоклітинні або багатоклітинні зачатки рослинних організмів, які потрібні для розмноження та поширення грибів, а також зберігання виду в несприятливих умовах.

**Фітосанітарна експертиза (аналізи)** – перевірка об'єктів регулювання в лабораторних умовах на предмет наявності та ідентифікації або відсутності шкідливих організмів.

**Хвороби рослин** – порушення нормального обміну речовин у рослинах під впливом фітопатогенів (грибів, бактерій, мікоплазм, віроїдів тощо) або несприятливих умов природного довкілля.

**Центрифугування і мікроскопічне аналізування** – виокремлення поверхнево розміщених спор грибів (іржистих, сажкових, «пасма льону» тощо), а також вилучання зооспорангіїв у стані спокою збудника раку картоплі із використанням спеціальних речовин та ідентифікація під мікроскопом.

**Шкідливий організм** – будь-який вид, штам або біотип рослин, тварин, патогенний агент, шкідливий для рослин чи продуктів рослинного походження, у тому числі комахи, кліщі, грибки, бактерії, віруси, нематоди та бур'яни.

## **1. Призначення, сфера застосування та відповідальність**

Дані методичні рекомендації призначені для проведення фітосанітарної експертизи (аналізів) об'єктів регулювання відповідно до вимог Закону України «Про карантин рослин» та на виконання фітосанітарних вимог країн-імпортерів, з метою визначення виду, вмісту сажкових зерен у зразку та зараженості спорами однієї зернини.

За хід проведення фітосанітарної експертизи (аналізу) та видачу точних і достовірних результатів відповідальність несе особа, яка уповноважена на проведення мікологічної експертизи (аналізу).

## **2. Необхідне обладнання**

### **2.1. Обладнання:**

- 2.1.1. мікроскоп зі збільшенням x4-x100;
- 2.1.2. біокулярний мікроскоп із збільшувальною здатністю 2x та 4x;
- 2.1.3. шафа сушильна лабораторна;
- 2.1.4. центрифуга;
- 2.1.5. шейкер орбітальний;
- 2.1.6. дільник проб;
- 2.1.7. ваги лабораторні електронні;
- 2.1.8. секундомір.

### **2.2. Лабораторне приладдя, посуд:**

- 2.2.1. предметні скельця;
- 2.2.2. колби Ерленмейєра 250 мл, 500 мл;
- 2.2.3. центрифужні пробірки;
- 2.2.4. пінцети (різних розмірів);
- 2.2.5. вата, марля;
- 2.2.6. одноразові латексні рукавички;
- 2.2.7. перманентний маркер;
- 2.2.8. папір (різного типу);
- 2.2.9. лупа зі збільшенням до 10x;
- 2.2.10. лоток;
- 2.2.11. штатив для пробірок;
- 2.2.12. камера Горяєва;
- 2.2.13. покривні скельця до камери Горяєва;
- 2.2.14. піпетки Пастера;
- 2.2.15. покривні скельця;
- 2.2.16. розбірна дошка;
- 2.2.17. сита.

### **2.3. Розчини та реактиви:**

- 2.3.1. 96%-ний розчин етилового спирту;
- 2.3.2. дезінфікуючий засіб;
- 2.3.3. дистильована або стерильна вода.

### **3. Підготовка до проведення фітосанітарної експертизи (аналізу)**

#### **3.1. Підготовка робочого місця**

Мікологічну експертизу (аналіз) проводять в умовах асептики. Перед початком та після закінчення фітосанітарної експертизи (аналізу) для уникнення контамінації спорами сажкових грибів зразків зерна – робочі поверхні, центрифугу, шейкер, ваги та дільник проб дезінфікують асептичним засобом, або ж 96 %-м розчином етилового спирту. У необхідному порядку розміщують посуд та інструменти, одноразові латексні рукавички.

При проведенні аналізу температура в приміщенні лабораторії повинна бути в межах 18–25°C, відносна вологість до 80%.

#### **3.2. Стерилізація посуду та інструментів**

Лабораторний посуд, необхідний для проведення мікологічної експертизи (аналізу) миють застосовуючи рідкі засоби для миття, до яких не входять біологічні домішки. Після миття посуд ретельно промивають спочатку проточною, після проточної дистильованою водою та стерилізують відповідно до вимог стерилізації лабораторного посуду, що застосовується. Інструменти протирають 96 %-ним розчином етилового спирту або асептичним засобом.

#### **3.3. Вимоги щодо безпеки під час проведення фітосанітарної експертизи (аналізу)**

Усі матеріали, які взаємодіють із зразком зерна, можуть бути контаміновані спорами грибів, що може негативно впливати на здоров'я людини. Під час експертизи (аналізу) необхідно дотримуватись засобів індивідуального захисту, а саме: одягнути захисний халат, рукавички та медичну маску. За необхідності для попередження негативних наслідків під час роботи із продукцією, яка підлягала фумігації одягнути респіратор, тощо.

Електрообладнання (центрифуги, шейкери тощо) треба заземлювати і роботи з ними необхідно виконувати відповідно до чинних інструкцій з техніки безпеки.

#### **3.4. Підготовка зразків об'єктів регулювання**

Розмір зразка для проведення фітосанітарної експертизи (аналізу) зерна повинен відповідати вимогам:

- наказу Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України «Про затвердження Методів інспектування, огляду, у тому числі відбору зразків, та проведення фітосанітарної експертизи (аналізів)» від 22.02.2021 року № 343;

- ДСТУ 3355-96 «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб в процесі карантинного огляду та експертизи».



Для проведення мікологічної експертизи (аналізу) зразки об'єктів регулювання надходять у послідовності, зазначеній в п. 6.1.1 ДСТУ 4180-2003 Карантин рослин. Методи мікологічної експертизи підкарантинних матеріалів (далі – ДСТУ 4180 – 2003). Разом із зразком в окремій упаковці надходять залишки сходів із сит – у разі просіювання, чи спливів – у разі флотації від попередньої експертизи (аналізу).

#### 4. Опис та хід проведення фітосанітарної експертизи (аналізу)

Зазначені у даних методичних рекомендаціях методи можуть застосовуватися окремо, незалежно один від одного, або комплексно за вимогою замовника.

##### 4.1. Визначення та ідентифікація грибних хвороб у зразку

Визначаючи зараженість зерна хворобами, встановлюють наявність або відсутність грибних хвороб, їх збудників, видовий склад і ступінь зараженості. Мікологічну експертизу (аналіз) проводять відповідно до п. 6.2 макроскопічний метод та п. 6.3 центрифугування і мікроскопічне аналізування ДСТУ 4180-2003.



**Рис. 1. Сажка (мішечки заповнені чорною споровою масою)**

(ДУ «Волинська обласна фітосанітарна лабораторія», 2024 рік)

**4.1.1.** Для аналізування висипають зразок зерна на розбірну дошку тонким шаром і ретельно оглядають за допомогою лупи з невеликим полем зору на наявність сажкових утворів та спор у зерні за явними ознаками.

**4.1.2.** Для аналізування із різних місць зразка відбирають від 5 до 25 г (200 шт.) зернин із різними ознаками ураження.

Відібране зерно висипають у колбу, заливають водою та струшують 5 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 5 препаратів та ідентифікують виявлені гриби за допомогою мікроскопа (збільшення x10-x40).



**Рис. 2.** Зерно пшениці уражене індійською сажкою (*Tilletia indica* Mitra)

(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1/epp.12452>)

**4.1.3.** При виявленні спор збудників грибних хвороб проводять їх ідентифікацію відповідно до додатків А, Б даних Методичних рекомендацій, а також Стандарту ЄОЗР з фітосанітарних заходів серії РМ 7 - Діагностичні протоколи для регульованих шкідливих організмів РМ 7/29 *Tilletia indica* (далі – РМ 7/29), довідкової літератури та колекційного матеріалу.

**4.1.4.** Після ідентифікації спор сажки, готують мікропрепарати згідно Додатку В.

## **4.2. Визначення зараженості спорами сажки шляхом промивання через сита**

Виділення теліоспор із необробленого зерна або насіння проводять шляхом промивання через сита певного діаметру у відповідності до стандартів Європейської та Середземноморської організації захисту рослин згідно діагностичного протоколу РМ 7/29.

**4.2.1.** Проводять підготовку сит до роботи.

**4.2.2.** Формують проби зерна відповідно до рівня забруднення

Таблиця 1.

Кількість повторних 50-грамових підзразків, необхідних для виявлення різних рівнів забруднення з визначеною достовірністю, припускаючи рівномірний розподіл теліоспор

Рівень забруднення теліоспор на 50-грамовий зразок	Кількість повторних зразків, необхідних для виявлення відповідно до рівня довіри (%)		
	99%	99,9%	99,99%
1	3	5	6
2	2	3	4
5	1	1	1

**4.2.3.** Кожну наважку зерна поміщають в 250 мл колбу, додають 100 мл водного розчину та проводять струшування.

**4.2.4.** Поміщають нейлонове сито з розміром сітки 53-мкм (діаметром 11 см) у лійку над чистою 500 мл колбою. Після струшування весь вміст колби виливають на сито.

**4.2.5.** Проводять ополіскування 250-мл колби (20-50 мл води) та зерна, розміщеного на ситі 53-мкм, доводячи об'єм до 300-400 мл.

**4.2.6.** Знімають 53-мкм сито, лійку промивають двома аліквотами (10-20 мл) дистильованої води, збираючи воду в ту саму колбу на 500 мл.

**4.2.7.** Поміщають нейлонове сито з розміром сітки 20 мкм (діаметром 4 см) у лійку, встановлену над другою колбою, об'ємом 500 мл. Виливають суспензію, зібрану з попередніх промивань, через сито з вічками 20 мкм.

Двічі промивають першу 500-мл колбу 20 мл води і виливають на 20-мкм сито.

**4.2.8.** Розміщують 20-мкм сито під кутом 45° і обережно змивають осад на мембрані (сітці) і на стінках сита до однієї сторони.

**4.2.9.** Використовуючи піпетки Пастера вибирають суспензію, зібрану з краю 20-мкм сита і поміщають суспензію в пробірки для центрифугування (15мл). Повторюють ці кроки, доки 20-мкм сито не виглядатиме чистим (5-10 повторів).

**4.2.10.** Центрифугують одержану суспензію при 1000 об/хв впродовж 3 хв.

**4.2.11.** Обережно видаляють надосад. До осаду додають дистильовану воду для отримання кінцевого об'єму в 50-100 мкл і більше.

**4.2.12.** Переносять аліквоти суспензії об'ємом 20-мкл на предметне скельце і накривають покривним склом та проводять дослідження усієї суспензії під мікроскопом.

**4.2.13.** Проводять визначення виду виявлених теліоспор.

### 4.3. Визначення вмісту сажкових зерен у зразку



**Рис. 3. Сажкове зерно пшениці**  
(<https://www.fitolab.volyn.ua/informuiemo/544-sazhkovi-khvoroby-zernovykh-kultur>)

**4.3.1.** Після виявлення та ідентифікації зразок зерна звільняють від крупної смітцевої домішки у відповідності до п. 3.1.5.1 ГОСТ 30483-97 Зерно. Методы определения общего и фракционного содержания сорной и зерновой примесей; содержания мелких зерен и крупности; содержания зерен пшеницы, поврежденных клопом-черепашкой; содержания металломагнитной примеси (далі – ГОСТ 30483-97), просіюють крізь сито з

діаметром отворів, зазначеним у додатку Е.

**4.3.2.** За допомогою дільника проб виділяють наважку зерна масою 50 г.

**4.3.3.** Просіюють крізь сито з тривалістю вказаною в додатку Е. Схід сита звільняють від смітцевої і зернової домішок: биті, пошкоджені теплом, зерна злакових культур, пророслі зерна, зерна пошкоджені шкідниками, зерна із забарвленим зародком, пошкоджені морозом і незрілі зерна (зелені), мінеральну, органічну, шкідливу домішки та зіпсоване зерно.

**4.3.4.** Після відокремлення всіх зазначених вище домішок зерно, що залишилося, просіюють крізь сито з тривалістю вказаною в додатку Е. Увесь прохід сита відносять до дрібних і щуплих зерен. (Схематичне зображення у Додатку Д).

**4.3.5.** Зі сходу сита після другого просіювання формують наважку масою 20 г і зважують її з точністю до другого десяткового знаку.

**4.3.6.** Із наважки вибирають зерна із зовнішніми ознаками ураження збудниками сажкових хвороб, а саме з потемнінням борідки та борозенки, сажковими мішечками різного ступеню розвитку та тьмяним кольором зерна, зважують з точністю до другого десяткового знаку.

**4.3.7.** Вміст сажкових зерен  $X_c$ , % вираховують за формулою:

$$X_c = \frac{m_c \times 100}{20} = 5m_c \quad (1.1)$$

де,  $m_c$  - маса сажкових зерен, виділених із наважки масою 20 г.

Аналізування проводять у двох паралелях.

*Примітка: Достатня маса зразка для проведення фітосанітарної експертизи (аналізу) становить 1000 г. Оскільки маса ураженого зерна сажкою менша за здорове - вагу зернини вказувати з точністю до 0,001 г.*

#### 4.4. Визначення зараженості спорами сажки однієї зернини



**Рис. 4.** Тверда сажка пшениці (*Tilletia caries* Tul.): загальний вигляд спорових мішечків (сорусів) (<https://img.ua/novini/vyznachennya-spor-sazhky-metodom-mikologichnoyi-ekspertyzy>)

**4.4.1.** З середньої проби виділяють чотири робочі проби по 100 зерен у кожній у відповідності до п. 11.4.2.2.3. ДСТУ 4138-2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості та Додатків Г5, Г6 ДСТУ 3768:2019 Пшениця. Технічні умови.

**4.4.2.** Кожну робочу пробу поміщають у колбу, заливають 10 см<sup>3</sup> дистильованої води і збовтують впродовж 5 хв.

**4.4.3.** Зерно з характерними зовнішніми ознаками для сажки (мішечки заповнені споровою масою) збовтують та одержані суспензії оглядають під мікроскопом без попереднього центрифугування. За дуже низьких концентрацій спор у

суспензіях проводять їх центрифугування.

Одержані суспензії спор переливають у центрифужні пробірки і центрифугують впродовж 1- 5 хв при 600 обертах на хвилину.

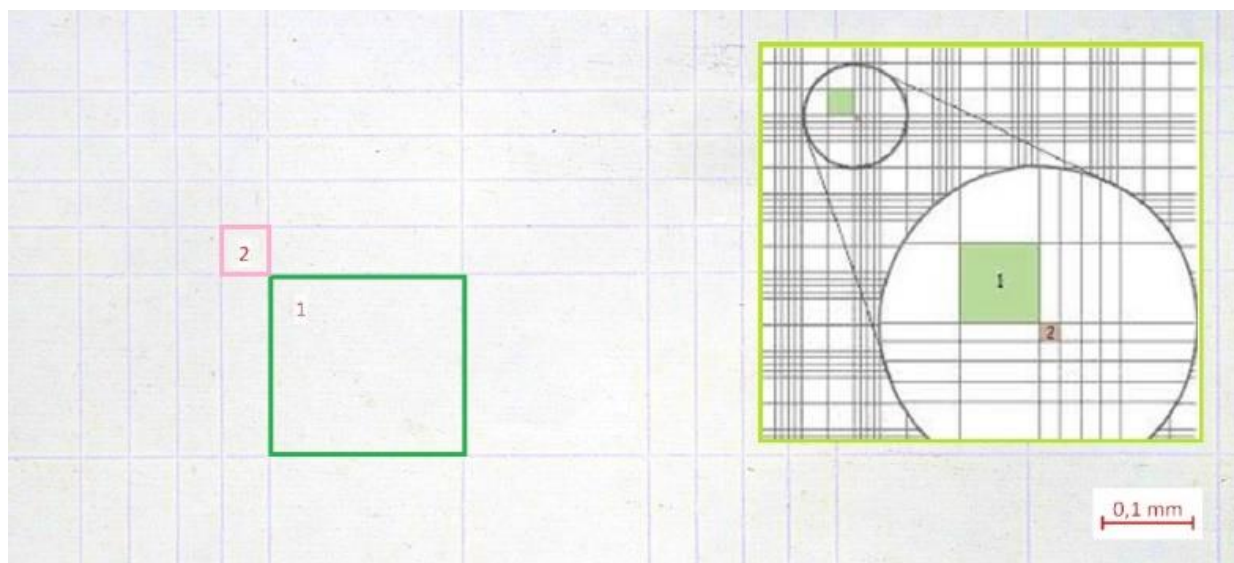
**4.4.4.** Після закінчення центрифугування із пробірок обережно видаляють 9 см<sup>3</sup> надосадової рідини. Осад, який залишився, піпетують.

Одержаний препарат переносять в камеру Горяєва та проглядають під мікроскопом.

З кожної проби виготовляють один препарат.

**4.4.5.** Під час роботи з мікроскопом першим етапом є визначення загального фону заспороженості суспензії. Відповідно до цього роблять висновок: які квадрати камери Горяєва (великі чи малі) вибрати для

зручності підрахунку спор. В окремих випадках, за дуже малої концентрації спор, для підрахунку беруть всю площу камери. Підраховують кількість спор, що знаходяться в межах квадрату та на лівій і верхній межі квадрату. Кількісний підрахунок спор проводять у камері Горяєва.



1 – великий квадрат камери Горяєва;  
2 – малий квадрат камери Горяєва.

**Рис. 5.** Загальний вигляд сітки камери Горяєва  
(ДУ «Волинська обласна фітосанітарна лабораторія», 2024 рік)



**Рис. 6.** Теліоспори збудника твердої сажки пшениці (*Tilletia caries* Tul.) у камері Горяєва (ДУ «Волинська обласна фітосанітарна лабораторія», 2024 рік)

**4.4.6.** Зараженість спорами однієї зернини (Сз) у штуках обчислюють за формулою:

а) без попереднього центрифугування:

$$C_3 = \frac{C_1 \times 10}{100} \quad (1.2)$$

де  $C_1$  - кількість спор у  $1 \text{ см}^3$  суспензії, шт/см<sup>3</sup>;  
 $10$  - об'єм води, взятої для змиву, см<sup>3</sup>;  
 $100$  - кількість зернин, яка взята для аналізування, шт.

б) з центрифугуванням:

$$C_3 = C_1 : 100 \quad (1.3)$$

де  $C_1$  – кількість спор в  $1 \text{ см}^3$  суспензії, шт/см<sup>3</sup>;  
 величину  $C_1$  обчислюють множенням виявленої кількості спор  
 у великих квадратах камери Горяєва на 250 000,  
 у малих – на 400 000.  
 Якщо підраховують спори на всій площі камери, то виявлену кількість спор множать на  
 1111;  
 $100$  – кількість зернин, яка взята для аналізування, шт.

**4.4.7.** Результатом аналізування є середньоарифметичне із чотирьох проб.

По завершенню мікологічної експертизи (аналізу) стіл, обладнання та лабораторні інструменти дезінфікують.

## ДОДАТКИ

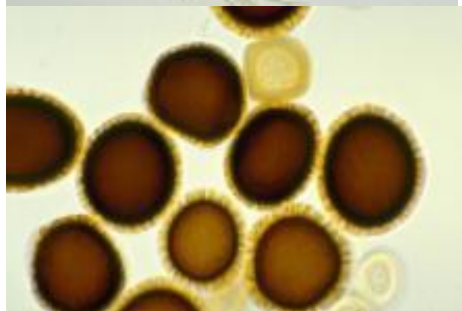
### Додаток А. Морфологічна ідентифікація сажки

№	Вид	Форма теліоспор	Колір теліоспор	Розмір теліоспор, мкм	Інкрустація
1	<b>Tilletia indica Mirra</b> син. Neovossia indica (Mirra) Mundkur	Куляста чи овальна, іноді з невеликим фрагментом гіф	Теліоспори мають червонувато-коричневий або темно-коричневий колір. Зрілі теліоспори чорні та непрозорі з загостреними або усіченими шипами 1,4-5,0 мкм заввишки	22-47 мкм в діаметрі, іноді до 64 мкм	З товстою сітчастою оболонкою, обмеженою тонкою безбарвною мембраною
2	<b>Tilletia controversa Kuehn.</b> син. Tilletia brevifaciens G. Fischer., Tilletia nanifica (Wagner) Savulescu	Куляста, яйцевидна, рідше продовгувата	Темно-коричневий	19-28 за іншими джерелами: 19-23x19-22	Сітчаста
3	<b>Tilletia caries Tul.</b> син. Tilletia tritici (Bjerk.) Wint	Куляста або округла	Від світло – до темно-коричневого	14-25 x 12,6-21	Сітчаста
4	<b>Tilletia foetida Liro.,</b> син. Tilletia laevis Kuehn	Шаровидна, еліпсоїдальна або продовгувата	Від світло – до темно-коричневого	13,5-22,5 x 12,6-18	Гладка

## Додаток Б. Симптоми захворювання та вигляд теліоспор різних видів сажки



Зовнішні прояви сажкових хвороб ([https://www.agrolink.com.br/problemas/carie\\_1894.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/carie_1894.html))



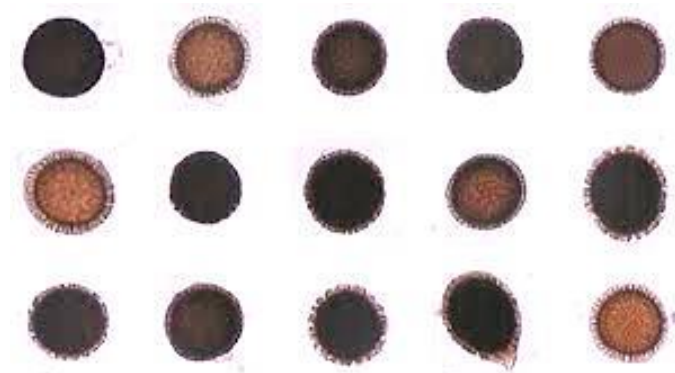
**Tilletia indica Mitra**

(<https://gd.eppo.int/taxon/NEOVIN/photos>)

**Індійська сажка (*Tilletia indica* Mitra)** уражує пшеницю, тритикале, жито. Симптоми захворювання найчастіше проявляються у період цвітіння.

Характерними ознаками ураження є часткове перетворення насіння в чорну спорову масу теліоспор, які мають запах гнилої риби. Уражаються лише 1-5 колосків у колосі. Часто спостерігається руйнування зародкової частини або борозенки зернівки.

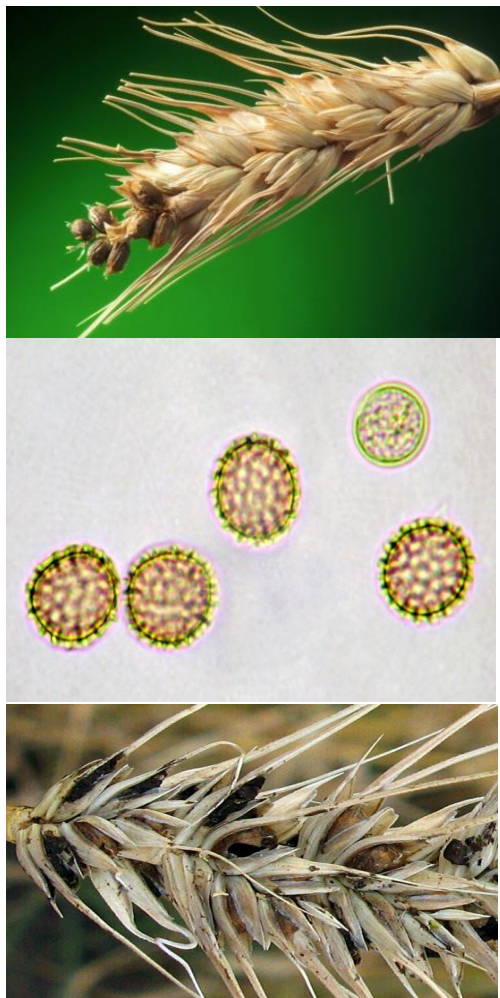
Ураження спостерігається тільки після виходу колоса із пазухи листка. Гриб спричинює зменшення довжини колоска і кількості колосків. Уражені рослини можуть бути карликові. Соруси довгасті або яйцевидні 1-3 мм у діаметрі, розвиваючись утворюють коричнево-чорну пилкову масу спор.



**Теліоспори *Tilletia indica* Mitra**

(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12452>)





**Tilletia controversa Kuehn**  
(<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.53924>)

**Карликова сажка (*Tilletia controversa* Kuehn.)** уражує пшеницю. За зовнішніми ознаками схожа з твердою сажкою.

У хворих рослин виявляються симптоми карликовості, рослини дуже кущаться, утворюючи 30 стебел і більше. Довжина таких стебел, як правило, в 2-4 рази менша ніж у здорових рослин.

Уражений колос щільніший, ніж при зараженні твердою сажкою, а колоскові луски розсунуті так, що колосся виглядає пір'ястим.

У колосі замість зерна утворюються дрібні сажкові мішечки з заокругленим верхнім конусом і маленьким відростком.

Колос інфікованих рослин часто не виходить із піхви верхнього листка або залишається наполовину покритим до повного досягання. У хворих рослин спостерігається раннє колосіння і галуження колосу, що не характерно для здорових рослин. Галуження колосу частково відбувається за рахунок збільшення кількості колосових лусок. У колосків уражених рослин нижні остюки вкорочені, zdeформовані.



**Tilletia caries Tul.**

(<https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/full/10.1079/pwkb.species.53923>)

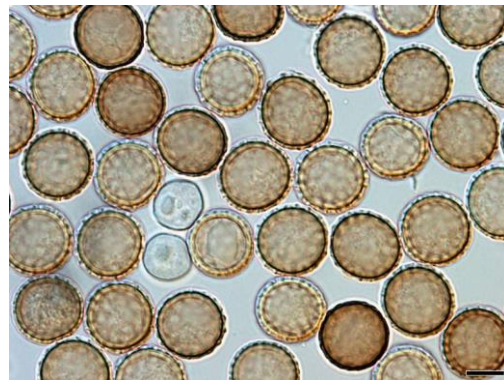
Симптоми ураження **твердою сажкою (*Tilletia caries* Tul. син. *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint)** помітні на початку молочної стиглості, а саме: колос децю сплюснений, інтенсивно зелений із синім відтінком, колоски неприродньо розпушені.

При роздавлюванні уражених зернівок у фазі молочної стиглості з них виділяється сірувата рідина із запахом триметиламіну (запах гнилих оселедців), у зв'язку з чим іноді тверду сажку називають "смердючою".

Під час досягання рослин різниці в забарвленні уражених і здорових колосків поступово зменшується і повністю зникає у фазі воскової стиглості.

У фазі молочно-воскової стиглості в уражених колосках замість зерна утворюються соруси збудника хвороби, їх називають "споріві мішечки".

В зернівках замість зерна утворюються мішечки з теліоспорами гриба.



**Теліоспори *Tilletia caries* Tul.**

(<https://www.padil.gov.au/aus-smuts/pest/140173>)



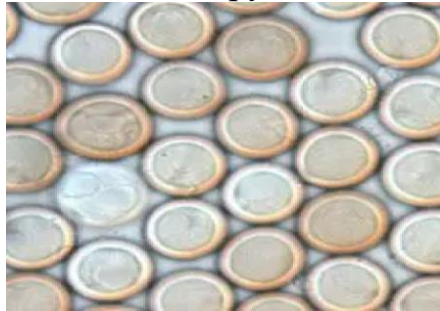
**Tilletia foetida Liro.**

([https://www.agrolink.com.br/problemas/carie\\_1894.html/](https://www.agrolink.com.br/problemas/carie_1894.html/))

Ознаки ураження твердою сажкою (**Tilletia foetida Liro.**, син. *Tilletia laevis* Kuehn) з'являються у фазі молочної стиглості зерна. Колос в уражених рослин дещо сплющений, має інтенсивне синьо-зелене забарвлення, а лусочки колосків – розсунуті із яких виглядають верхівки сорусів. Останні мають овальну форму, а на верхівці дещо загострені.

У них замість ендосперму розвивається спорова маса темного відтінку. Маса сорусів значно менша, ніж здорового насіння, в зв'язку з чим до початку повної воскової стиглості уражений колос залишається прямостоячим, тоді як здорові, під масою налитого насіння, нахиляються до поверхні землі.

При роздавлюванні уражених колосків виділяється сірувата оливково-бура рідина



**Теліоспори Tilletia foetida Liro.**

(<https://img.ua/novini/vyznachennya-spor-sazhky-metodom-mikologichnoyi-ekspertyzy/>)

## **Додаток В. Приготування тимчасових та постійних мікропрепаратів**

**Тимчасові препарати.** Досліджуваний рослинний або інший матеріал поміщають на предметне скло в краплю води, накривають покривним склом і ідентифікують під мікроскопом.

**Постійні препарати.** Відповідно до ДСТУ 4180-2003 (Додаток Д) мікроскопічний препарат заправляють в гліцерин-желатин, підготовлений таким чином: 17 г желатину заливають у колбі 100 мл води і залишають на декілька годин. Після чого, підігрівачи колбу з желатином, додають 117 г чистого гліцерину і 0,1 г фенолу. Для того щоб освітлити суміш додають один білок сирого курячого яйця до невеликої охолодженої частини суміші. Після чого доливають іншу частину гліцерин-желатину; добре розмішавши скляною паличкою та підігрівачи дану суміш до кипіння. Білок відфільтровують через вату, прозорий гліцерин-желатин розливають по невеликих плоскодонних пробірках, які закривають пробками.

Досліджуваний матеріал поміщають у краплю гліцерин-желатину, нанесену на предметне скло і обережно накривають покривним склом.

### **Другий спосіб приготування постійних препаратів**

На сухе предметне скло нанести невеликий шматок твердого гліцерин-желатину, підігріти над полум'ям спиртівки; коли він стане рідким, помістити в нього досліджуваний матеріал і накрити покривним склом. Для зберігання постійних препаратів їх окантовують по краях покривного скла спеціальним лаком: асфальтовий або безкольоровий меблевий лак, або клей БФ-2, лак для нігтів.

## Додаток Г. Поводження зі зразками

Регульований шкідливий організм, відсутній в Україні Індійська сажка пшениці (*Tilletia indica* Mitra), яка виявлена під час фітосанітарної експертизи (аналізу), обліковується та зберігається як зразок-документ впродовж 6 місяців. Після чого, за потреби, переводиться в колекційний матеріал та заноситься до реєстру, або знищується шляхом спалювання чи автоклавування.

Невикористані частини зразків, у яких виявлено Індійську сажку пшениці (*Tilletia indica* Mitra), зберігають в окремому приміщенні не менше 30 днів. Термін зберігання контролюється в журналі обліку. Після закінчення терміну зберігання невикористані частини зразків з встановленою періодичністю знищуються в безпечний спосіб, про що складається відповідний акт.

Зразки-документи виявлених не карантинних шкідливих організмів зберігаються 30 днів.

Залишки зразків, в яких не виявлені регульовані шкідливі організми, повертаються замовнику. В програмному забезпеченні, яке використовується системою керування лабораторії, у «Протоколі фітосанітарної експертизи» фіксується поведження із зразками. Якщо замовник відмовляється забрати залишки зразків та у них не виявлено регульовані шкідливі організми, вони видаляються як поточне сміття після завершення робочого дня.

## Додаток Д. Схема аналізування зерна на вміст домішок



## Додаток Е. Перелік лабораторних сит та тривалість просіювання

Назва культури	Лабораторні сита, необхідні для проведення фітосанітарної експертизи (аналізу)			Тривалість просіювання
	Крупна сміттєва домішка	Сміттєва/зернова домішка	Дрібні зерна	
Пшениця	6,0	1,0x20	2,0x20	30 с
Тритикале	6,0	1,0	1,7x20	30 с
Жито	6,0	1,0	1,4x20	3 хв
Ячмінь	6,0	1,5	2,2x20	3 хв
Овес	6,0	1,5	1,8x20	3 хв
Кукурудза	8,0	1,2x20	1,2x20	3 хв
Просо	6,0	1,4x20	-	3 хв

## ЛІТЕРАТУРА

1. Закон України “Про карантин рослин” (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3348-12#Text>.
2. Порядок проведення інспектування, огляду, фітосанітарної експертизи (аналізів), повторної фітосанітарної (арбітражної) експертизи (аналізів), нагляду, обстеження, моніторингу, знезараження об’єктів регулювання, оформлення сертифікатів, передбачених Законом України “Про карантин рослин”, контролю за проведенням огляду в частині відбору зразків та вибіркового контролю за проведенням фітосанітарної експертизи (аналізів) затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 15 листопада 2019 року № 1177 (електронний ресурс). Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1177-2019-%D0%BF#Text>.
3. Наказ Міністерства розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України «Про затвердження Методів інспектування, огляду, у тому числі відбору зразків, та проведення фітосанітарної експертизи (аналізів)» від 22.02.2021 року № 343 (електронний ресурс). Режим доступу: <https://www.me.gov.ua/Documents/Detail?lang=uk-UA&id=b0a4d05a-ec22-408c-8544-825125202bd6&title=NakazMinisterstvaRozvitkuEkonomiki-TorgivliTaSil'skogoGospodarstvaUkrainiVid22-02-2021-343-proZatverdzhenniaMetodivInspektuvannia-Ogliadu-UTomuChisliVidboruZrazkiv-TaProvedenniaFitosanitarnoiEkspertizi-analiziv->
4. ДСТУ 4180-2003 Карантин рослин. Методи мікологічної експертизи підкарантинних матеріалів.
5. ДСТУ 4138-2002 Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості.
6. ДСТУ 3768:2019 Пшениця. Технічні умови.
7. ДСТУ 3355-96 Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб в процесі карантинного огляду та експертизи.
8. ГОСТ 30483-97 Зерно. Методы определения общего и фракционного содержания сорной и зерновой примесей; содержания мелких зерен и крупности; содержания зерен пшеницы, поврежденных клопом-черепашкой; содержания металломагнитной примеси.
9. Стандарт ЄОЗР з фітосанітарних заходів, Діагностичні протоколи для регульованих шкідливих організмів РМ 7/29 (3) *Tilletia indica*.
10. Атлас болезней полевых культур. В. Ф. Пересыпкин. – К.: Изд-во «Урожай» – 1987.
11. Пидопличко Н.М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель: В 3 т. К.: Наук. думка, 1977.
12. Руководство по досмотру и экспертизе растительных и других подкарантинных материалов. Под. ред. А. А. Варшаловича. – М.: Изд-во «Колос», 1972.

Під час створення даних методичних рекомендацій також було використано загальнодоступні фотоматеріали з мережі Інтернет не для комерційних цілей та без наміру порушити авторські права їх власників.