



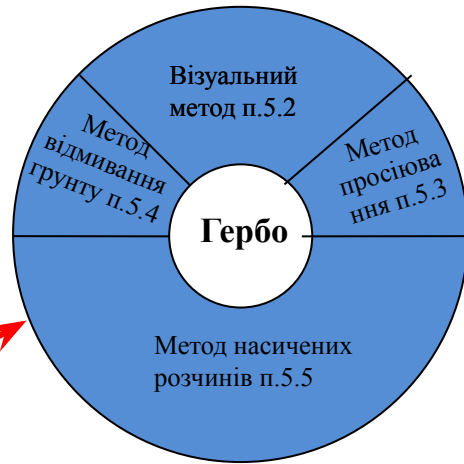
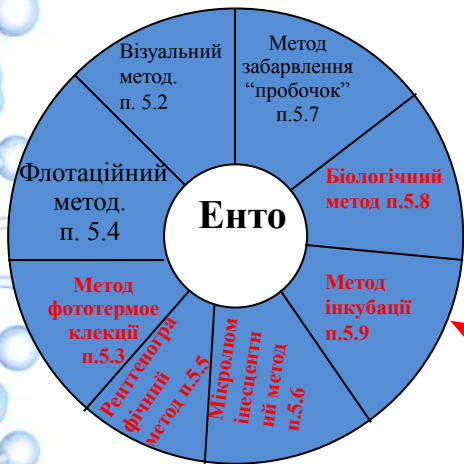
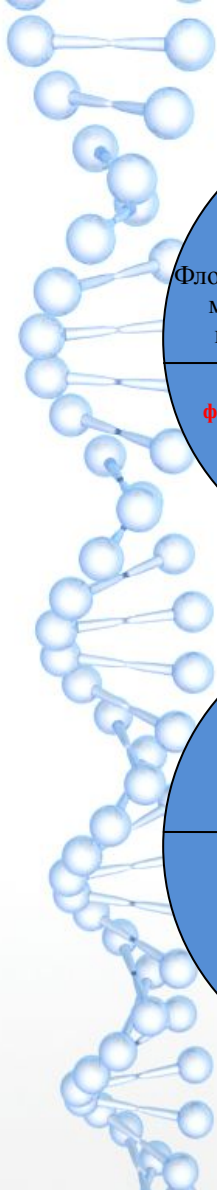
ДУ “Рівненська фітолабораторія”

Методи фітосанітарної експертизи (аналізів)

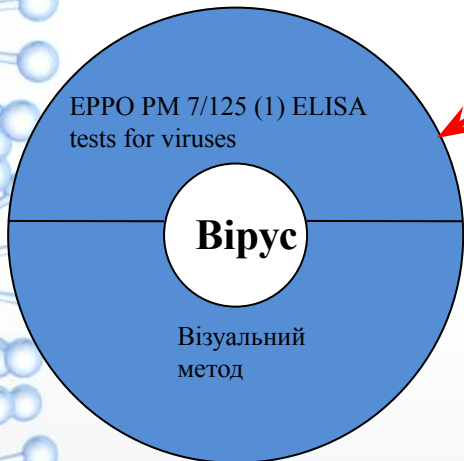


Методи проведення фітосанітарної експертизи (аналізів)

- ДСТУ 3354-96 - Методи ентомологічної експертизи
- ДСТУ 4180-2003 - Методи мікологічної експертизи
- ДСТУ 4009-2001 - Методи гербологічної експертизи
- ДСТУ 4009-2001 - Методи бактеріологічної експертизи
- ДСТУ ДСТУ 7406:2013 - Методи фітогельмінтологічної експертизи
- EPPO PM 7/125 (1) ELISA tests for viruses. Вірусологічна експертиза



Акредитовано
згідно ДСТУ
ISO/ IES
17025:2017





Ентомологічна експертиза

Наявність шкідливих комах та кліщів виявляють за допомогою ентомологічної експертизи згідно ДСТУ 3354-96 "Карантин рослин. Методи ентомологічної експертизи продуктів запасу". Даний стандарт описує методи ентомологічної експертизи продуктів запасу для встановлення їх фітосанітарного стану при імпортуванні, зберіганні, перевезенні чи експортуванні.

Ентомологічна експертиза – аналіз середньої проби об'єктів регулювання (продукції рослинного походження, ґрунту) для встановлення наявності, стану, чисельності та видового складу регульованих шкідливих організмів та інших видів комах і кліщів, з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів. Ентомологічній експертизі піддається середня проба, виділена з об'єднаної проби об'єктів регулювання, відібраної відповідно до ДСТУ 3355-96 Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб в процесі карантинного огляду та експертизи. Будь-який матеріал, що надходить в лабораторію на фітосанітарну експертизу, в першу чергу підлягає ентомологічній експертизі. Це зумовлено тим, що в ньому можуть виявитись живі шкідники в активному стані.

Для проведення ентомологічної експертизи, з метою встановлення явної та прихованої зараженості шкідників, використовуються такі методи:

- 1) 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.
- 2) Флотаційний — виявлення явної і прихованої зараженості продуктів запасу зануренням середньої проби зерна в розчини солей і аналіз комах, зерен тощо, що випливали на поверхню.
- 3) Забарвлення ”пробочок” — виявлення прихованої зараженості насіння і зерна зернових і бобових культур довгоносиками і зернівками забарвленням ”пробочок” на поверхні зерен розчинами перманганату калію.





Візуальний метод

- Підготовлену до експертного аналізу середню пробу висипають на аналізну дошку 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 схід 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 біокулярним мікроскопом.
- Прохід із сит від борошна, висівок і інших дрібних продуктів при великій кількості аналізують в 5 наважках по 20 г кожна. Для цього наважки висипають на білий

- Усіх виявлених і зібраних в 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.
- Використані сита після кожного аналізу знезаражують промиванням киплячою водою або прогрівають в сушильній шафі за температури не менше ніж 80 С протягом 10 хвилин.





Метод забарвлення ”пробочок”

- Від підготовленої до експертного аналізу і візуально перевіреної середньої проби підряд, без вибору відраховують не менше ніж 300 цілих зернин (насінин) і висипають у ситечко.
- В чашку наливають теплу, біля 30 С воду, всипають кристалики перманганату калію і розмішують до утворення насиченого кольору.
- Ситечко із зерном занурюють на 1 хв 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 с, де зерно набуває нормального забарвлення, а ”пробочки” залишаються темними.
- Промиті зерна висипають на фільтрувальний папір і швидко, доки забарвлення ”пробочок” не щезло, оглядають через лупу або під бінокулярним мікроскопом, відбираючи зерна з рівномірно забарвленими ”пробочками” округлої (випуклої) форми. Не враховують зерна з плямами неправильної форми, з інтенсивно забарвленими краями і світлою серединою.
- Відібрані зерна з ”пробочками” підраховують, розрізають скальпелем і визначають наявних за фазами розвитку (личинки, лялечки, імаго) живих і мертвих шкідників.
- При неможливості ідентифікувати виявлених живих преімагінальних фаз шкідників, їх збирають у пробірки, забезпечують етикеткою, щільно закупорюють і витримують до появи імаго згідно біологічного методу.



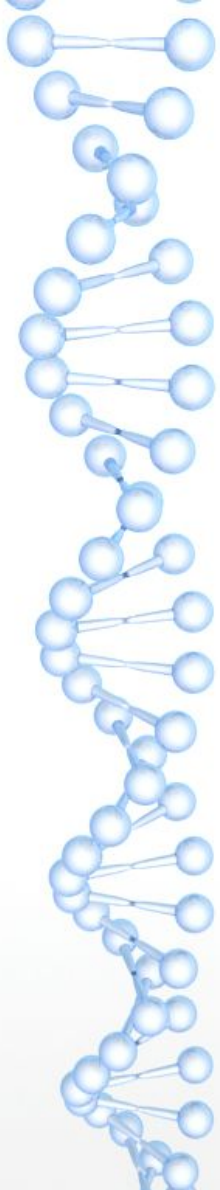
Гербологічна експертиза

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.



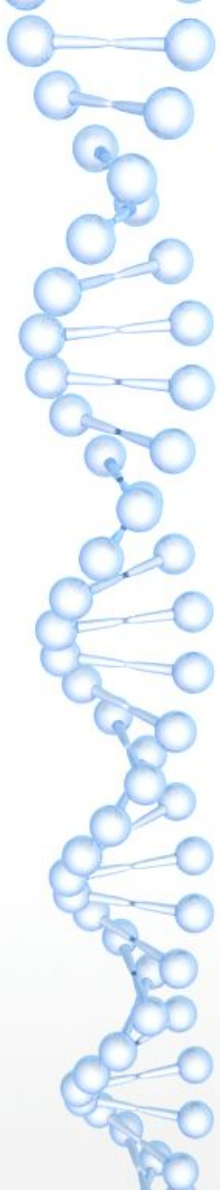
Методи:

- ▣ візуальне виявлення засміченості
- ▣ метод просіювання
- ▣ метод відмивання ґрунту



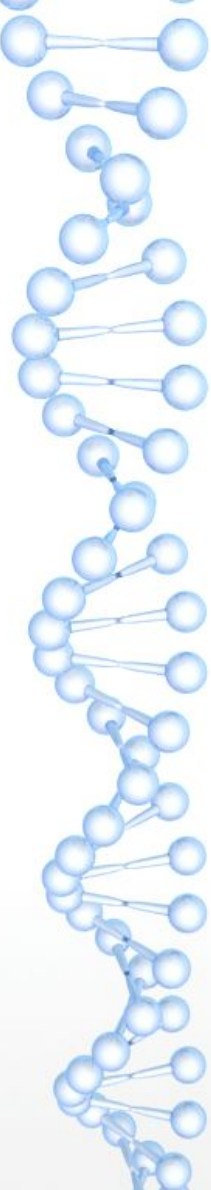
Візуальний – виявлення засміченості під карантинних матеріалів зовнішнім оглядом виїмок та середньої проби.

Підготовлену до експертизи аналізу середню пробу і рослинні залишки попередніх експертиз висипають на аналізну дошку або лоток окремо і ретельно переглядають. Виявлене насіння карантинних і потенційно небезпечних бур'янів відбирають пінцетом у пробірку або пакети для наступної ідентифікації.



Метод просіювання середньої проби через комплект сит в лабораторії та огляду і проходу з сит після просіювання сипучих матеріалів.

Після загального огляду середню пробу висипають у комплект сит або в пристрій механізований. Просіювання проводять вручну чи в механізованому пристрої повздовжньо-зворотними рухами за направленням довжини отворів в решітці протягом 3 хв із загальною кількістю коливань до 180. Сита підбирають таки 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 наступної ідентифікації. Використані сита після кожного аналізу



Метод відмивання – полягає в промивання середньої проби ґрунту чи іншого матеріалу на ситах під струменем води.

Сито тримають на раковину і промивають легким струменем води, перемішуючи м'яким пензликком. Промивання виконують до тих пір, поки з під сита не почне текти прозора вода. Струмись води повинен бути з мінімальним тиском, щоб уникнути розбризкування і можливого викидання насіння з сита. Кожну фракцію із сит оглядають через лупу, а дрібні домішки під бінокляром. Все виділене насіння бур'янів вибирають для наступної ідентифікації



Мікологічна експертиза

це досліджування рослинного

матеріалу для

встановлення зараженості його

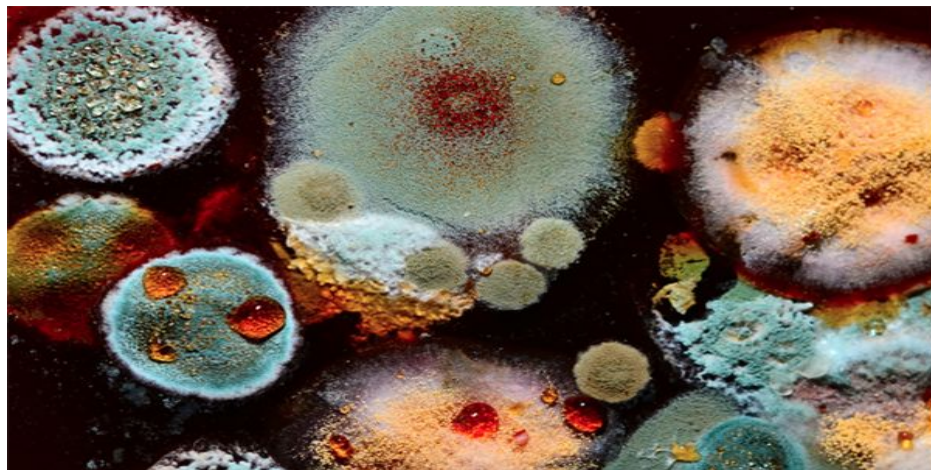
фітопатогенними організмами.

Макроскопічний метод

Використовують для візуального виявлення хвороб (зовнішні пошкодження, сажкові утвори, склероції у насінні).

Підготовлену для аналізуванню середню пробу і рослинні виділення попередньої експертизи висипають тонким шаром на аркуш білого паперу, скло, плівку і ретельно оглядають за допомогою лупи.

Насіння та частки уражених рослин на поверхні яких виявлено



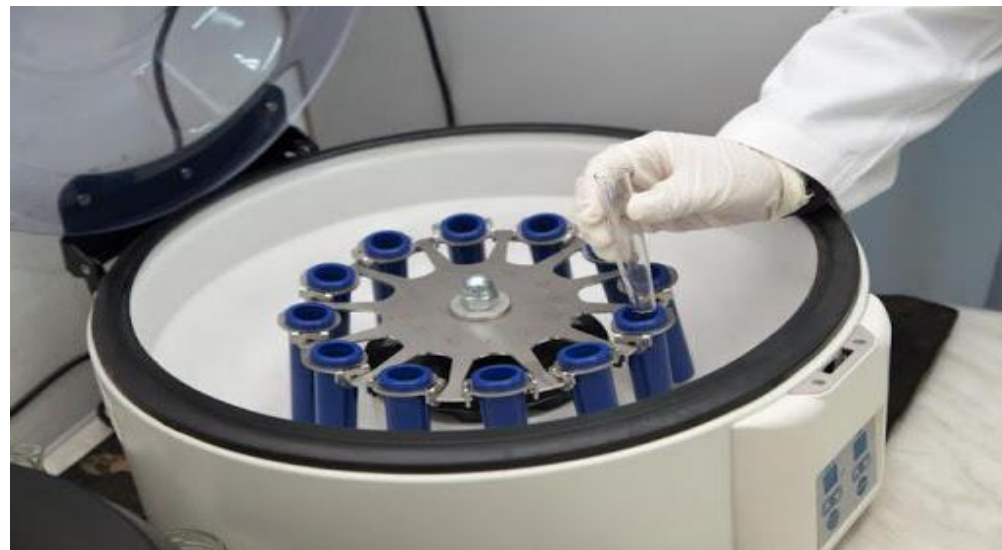
Центрифугування і мікроскопічне аналізування

Насіння, зерна чи інших матеріалів – виокремлення поверхнево розміщених спор грибів (іржастих, сажкових, “пасмо” льону тощо); а також вилучення зооспорангіїв у стані спокою збудника раку картоплі на бульбах із використанням спеціальних речовин та ідентифікування їх під мікроскопом.

Для аналізування із різних місць зразків відбирають 200 шт. насінин із різними ознаками ураженості (ДСТУ 2240; ГОСТ 28419).

Відібране насіння висипають у колбу (ГОСТ 1770), заливають 20 мл води, струшують 5 хв. насіння з гладкою поверхнею, 10 хв. – з шорсткою поверхнею.

Після струшування воду виливають у пробірки і центрифугують від 1 до 5 хв. за 600



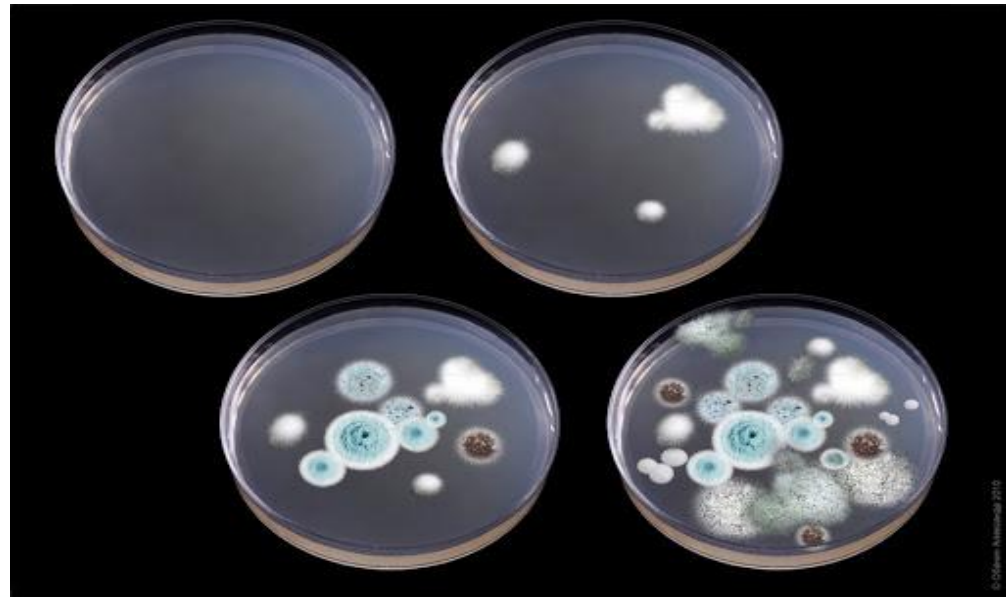
Біологічний метод

Виявлення в підкарантинному матеріалі зовнішньої та внутрішньої грибової інфекції методами інкубування у вологій камері чи посіву на поживні середовища.

Метод вологих камер оснований на стимулюванні розвитку і росту мікроорганізмів в ураженому насінні, плодах, листках, кореневищах тощо.

Із середнього зразка насіння відбирають 4 проби по 50 або 100 насінин (залежить від розміру насіння).

Для пророщування насіння у



Люмінесцентний метод

Виявлення внутрішньої грибкової інфекції у тканинах рослин за ознаками специфічної люмінесценції у випадку ультрафіолетового випромінювання.

Із наважки насіння відібраного з середнього зразка, виокремлюють насіння основної культури, які розкладають на чорний папір, поміщають під ультрафіолетовий освітлювач і оглядають. За свіченням насіння роблять



Методи визначення раку картоплі на бульбах та в ґрунті

Експертиза за методом Г.Н.

Дорогіна – визначення наявності зооспорангіїв збудника раку картоплі на поверхні підземних частин рослин, рослинних решток, ґрунті за допомогою центрифугування водного змиву.

Бульби, цибулини та інші частини рослини, промивають у невеликій кількості води. Воду потім зливають у хімічну склянку і дають відстоятися 3-5 хв., щоб

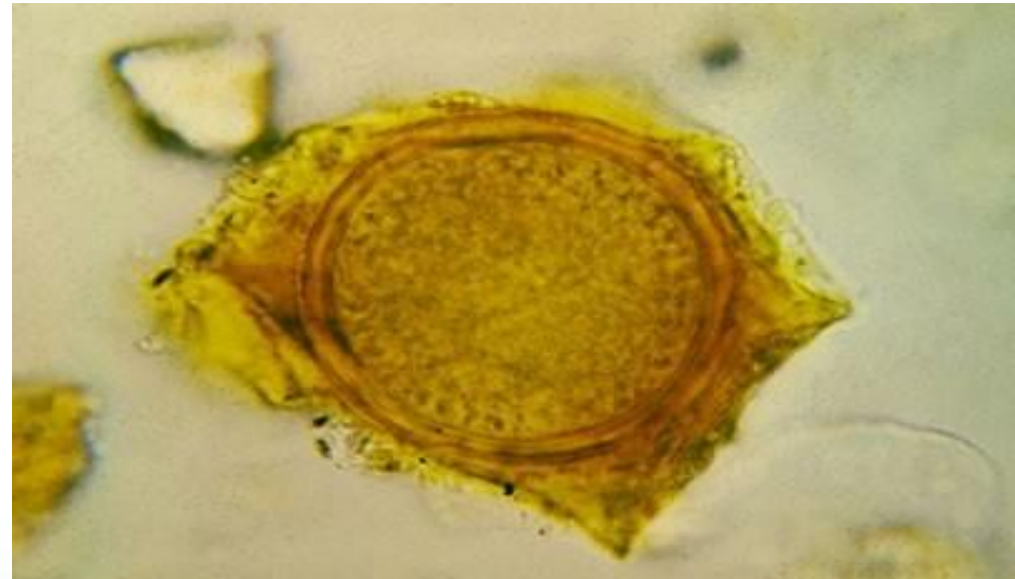


Експертиза за методом К.Є. Шарікова

Визначення наявності зооспорангіїв збудника раку картоплі в легких супіщаних та чорноземних ґрунтах.

Зразки ґрунту доводять до повітряно-сухого стану. Сухі зразки подрібнюють у фаянсовій ступці, просіюють через сито з отворами 1 мм і формують середню пробу, добре перемішують і відбирають наважку в 2-5 г, розтирають у ступці, просіюють через сито з отворами 0,25 мм.

Зооспорангії збудника раку картоплі, які перебувають у стані спокою легко проходять через сито, а великі





Фітогельмінтологічна експертиза

Мета фітогельмінтологічної експертизи рослинних матеріалів та ґрунту полягає у виявленні карантинних та інших видів паразитичних нематод.

Об'єктами регулювання, які підлягають фітогельмінтологічній експертизі є: саджанці, живці, квіткові цибулини, бульби, кореневища, рослини в горщиках, ґрунт, свіжі коренеплоди, картопля, пиломатеріали, тирса та інший пакувальний матеріал з дерева.

Методи виявлення нематод:

- літковий метод Бермана;
- метод паперових смуг;
- метод виділення





Лійковий метод Бермана

Метод полягає у виділенні нематод із субстрату у воду та їх осадженні на дно пробірки або чашки Петрі для збирання, підрахування та ідентифікування. Метод використовують для виділення нематод із будь-яких органів рослин (коренів, коренеплодів, бульб, цибулин, листків, стебел), а також із деревини та ґрунту

Випробування: наважки дослідного матеріалу переносять на сітки з синтетичного



Метод паперових смуг

Метод полягає у відмулюванні та фільтрації наважки ґрунту, внаслідок чого відбувається осадження цист на смужках фільтрувального паперу.

Метод застосовують для виділення цист цистоутворюючих нематод з ґрунту.

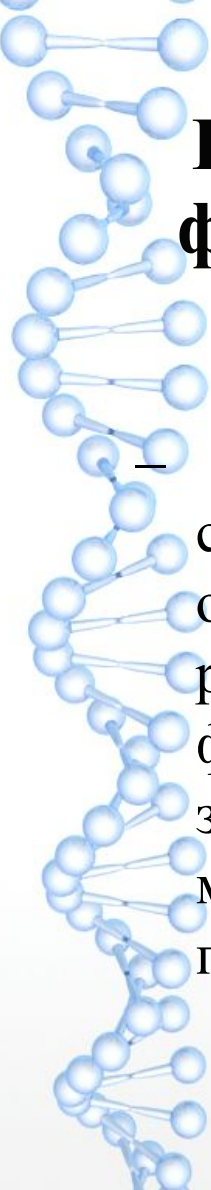
Випробування: пробу для аналізування (100 см³ переносять у склянку заповнену водою, потім її збовтують і дають відстоятися до осідання суспензії, після цього воду до осаду зливають на

Метод виділення галових і несправжніх галових нематод

Метод полягає у механічному виділенні самок галових і несправжніх галових нематод з тканини коренів рослин.

Випробування: корені розрізають скальпелем на відрізки довжиною 2-2,5 см, вміщують у чашку Петрі з невеликою кількістю питної води, поміщають під бінокулярну лупу і відшуковують уражені ділянки кореня. Від тканини кореня за допомогою двох препарувальних голок відділяють нерухомих статевозрілих самок і переносять у чашку Петрі в краплину води для подальшої ідентифікації.





РМ-Ф-01.19 Екстракція нематод під час проведення фітосанітарної експертизи зразків цибулі ріпчастої і коренеплодів (буряк, імбир, морква та інші)

– Випробування: рослинний матеріал розщеплюють на невеликі смужки та оглядають на наявність некрозів, деформацій, ослизнення та загнивання. Після огляду підготовлену наважку рослинного матеріалу переносять на марлю та зав'язують її формуючи мішечок, який поміщають на лійку або чашку Петрі та заливають водою. Час експозиції подрібненого рослинного матеріалу становить 3-6 год. Після чого оглядають осад, проводять ідентифікацію та приготування мікропрепарату.



Бактеріологічна експертиза

Бактеріологічна експертиза – методи виявлення та визначення у лабораторних умовах регульованих та інших збудників бактеріальних захворювань в об'єктах регулювання з метою запобігання або обмеження будь-якої шкоди внаслідок занесення або поширення шкідливих організмів на території України.

Бактеріологічна експертиза визначає ураженість підкарантинного рослинного матеріалу фітопатогенними бактеріями і може бути проведена такими способами:
анатомічним,

- макроскопічним;
- біологічним;
- імунофлюоресцентним методом;
- імуноферментним методом.



Анатомічний метод

Застосовують для виявлення внутрішньої зараженості рослин мікроскопіюванням незабарвлених і забарвлених зрізів з 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 у полум'ї горілки або спиртівки, після охолодження заливають спиртом, залишають на повітрі до повного випаровування і фарбують за Грамом.

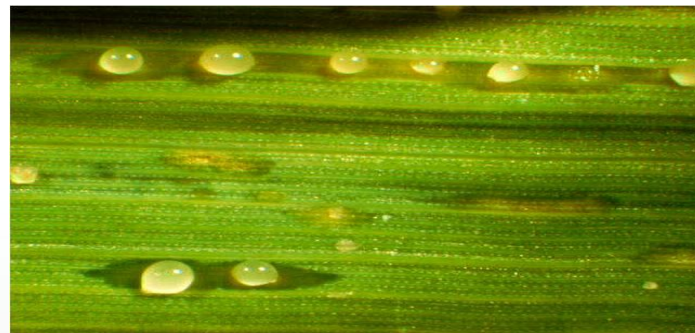
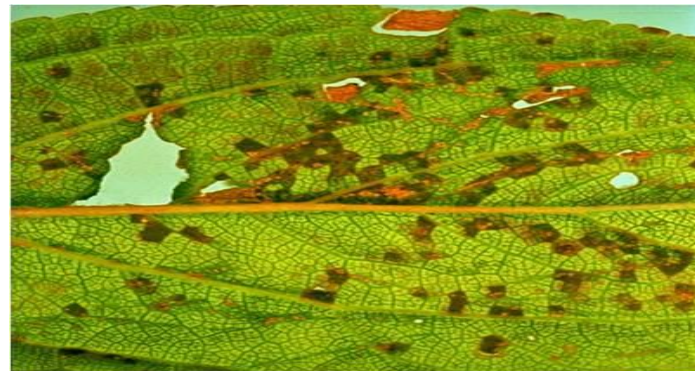
Зафарбовані препарати оглядають під мікроскопом з імерсійною системою. У кожному препараті оглядають не менш ніж 20 полів зору. На добре виготовлених зрізах видно бактерії, які містяться в тканинах рослин і особливо в судинах.

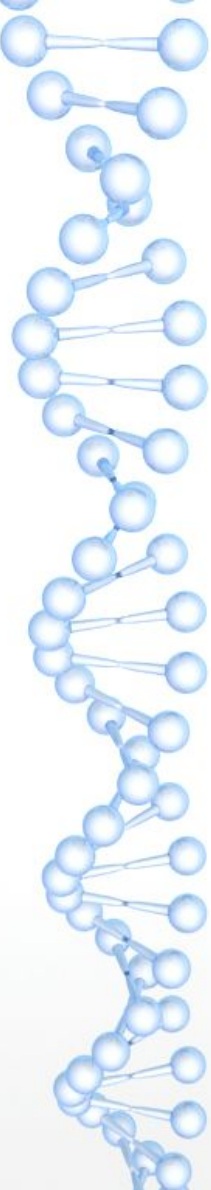
За наявними ознаками того чи іншого збудника бактеріальної хвороби проводять і ідентифікацію.

Макроскопічний метод

На бактеріологічну експертизу відбирають рослинні зразки (насіння, плоди, бульби, цибулини тощо) з найбільш типовими ознаками ураження, з яких потім виділяють збудників бактеріальних хвороб. Уражені частини рослин оглядають за допомогою лупи.

Плямистості характеризуються, як правило, неправильною формою, часто кутовою, для бактеріальної плямистості листя характерна відсутність на плямах нальотів або чорних крапок, що притаманні плямистостям мікологічного походження. Не рідко на уражених бактеріями органах рослин з'являються ексудат у вигляді краплин мутної рідини.





Деякі фітопатогенні бактерії мають здатність стимулювати посилене ділення клітин, в результаті чого на ураженому органі утворюються нарости або пухлини. При ураженні судинної системи спостерігається повне або часткове в'янення рослин, а уражене судинне кільце тьмяніє. На цибулинах, бульбах, коренеплодах і інших органах рослин, що містять багато поживних речовин, бактерії утворюють гнилі, при яких проходить руйнування міжклітинної речовини, а в подальшому і клітинних оболонок. В результаті уражений орган розм'якшується, утворюється мокра гниль з неприємним запахом.

Цей метод дозволяє 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.



Біологічний метод

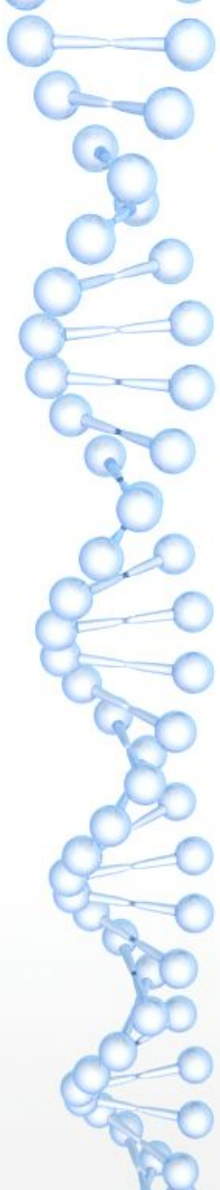
Метод ґрунтується на виявленні внутрішньої (прихованої) ураженості бактеріозами насіння та інших частин рослин.

Насіння відібране і підготовлене для аналізу поміщають у вологу камеру або висівають на живильний агар. Чашки Петрі поміщають в термостат. Якщо через деякий час на насінні утворюється ексудат або насіння ослизнюється , то асептичною петлею беруть краплину ексудату і переносять у пробірку з невеликою кількістю стерильної води. Пробірки струшують роблять посів на 3 чашки Петрі.

Волога камера готується так: добре помиті сухі чашки Петрі вистилають ватою товщиною 0,25см і покривають марлею або фільтрувальним папером, стерилізують та зволожують підстилку стерильною водою.

Уражені частини рослин та насіння розтирають у стерильній ступці з невеликою кількістю стерильної води . Одержану кашицю стерильною бак. петлею переносять на тверде поживне середовище. Поміщають у термостат, інкубують за температури 28-30⁰С.



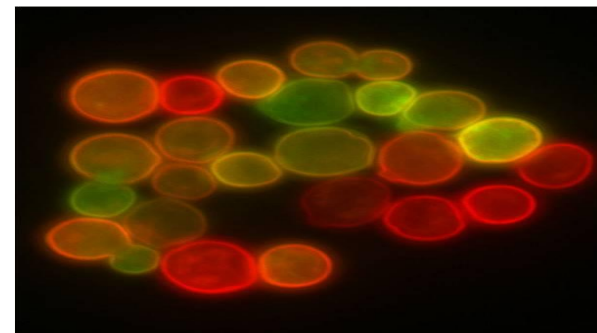


- Після завершення встановленого строку росту колоній проводять ідентифікацію збудників бактеріальної хвороби. Визначення ураженості насіння за виявленням збудників бактеріозів на сходах проводять методом виявлення хвороби на сім'ядольних листках у пробірках з піском.

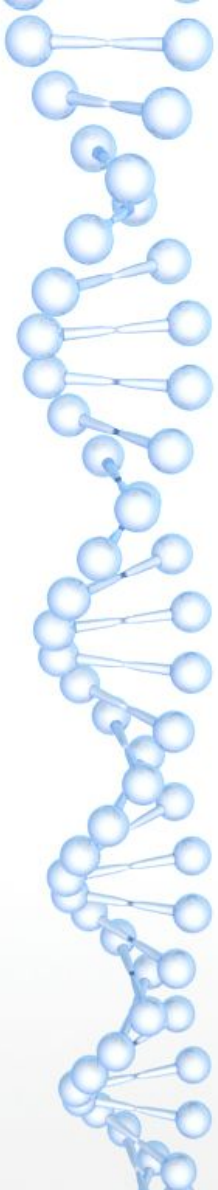


ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ МЕТОД

- В основі люмінесцентної мікроскопії лежить явище люмінесценції, тобто здатності деяких речовин світитися при опроміненні їх короткохвильовою частиною видимого світла або ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі, яка близька до довжини хвилі видимого світла.

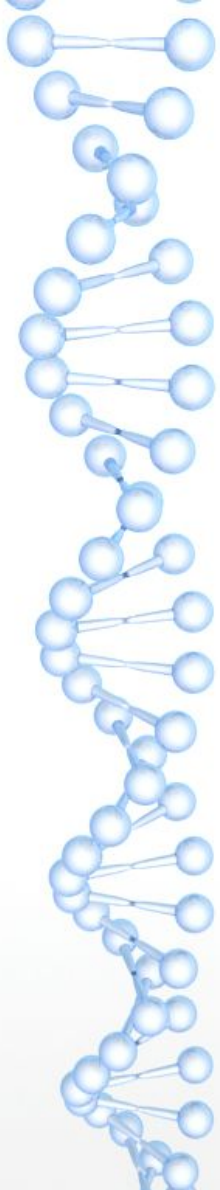


Люмінесцентна мікроскопія

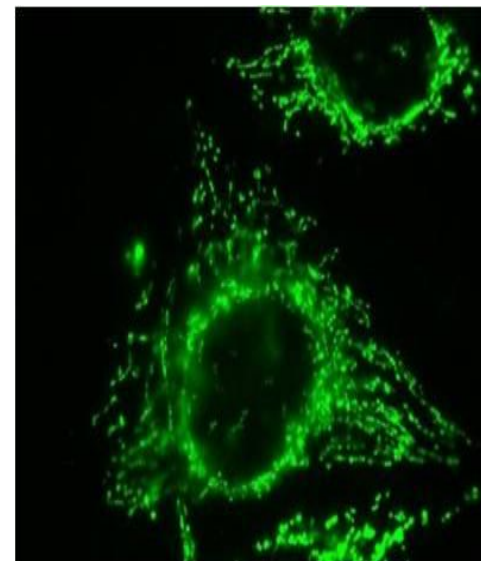


- Імунофлуоресцентний аналіз застосовують для виявлення антигенів та антитіл. Цей метод оснований на використанні реагентів, які є мічені флуоресцентними барвниками. Мічені антитіла зв'язуються з антигеном, утворюючи комплекси, які можна





- Мікроскопують в люмінесцентному мікроскопі і оцінюють результати. Якщо концентрація флуоресціюючих клітин з типовою морфологією у зразку більше 10^3 мкл/мл, то зразок вважається позитивним.
- Недоліки методу:
- специфічність і чутливість методу залежить від якості тест-систем, а також від техніки відбору зразка та умов зберігання досліджуваного матеріалу





Вірусологія

- Вірусологічний аналіз включає методи виявлення у лабораторних умовах та ідентифікації збудників вірусологічних хвороб рослин у об'єктах регулювання.
- Вірусологічний аналіз проводиться за допомогою:
 - - візуального методу;
 - -методу імуноферментного аналізу (ІФА);
 - - методу ПЛР (полімеразно-ланцюгової реакції);
 - - інших методів (відповідно до міжнародних і національних стандартів, інструкцій та рекомендацій).

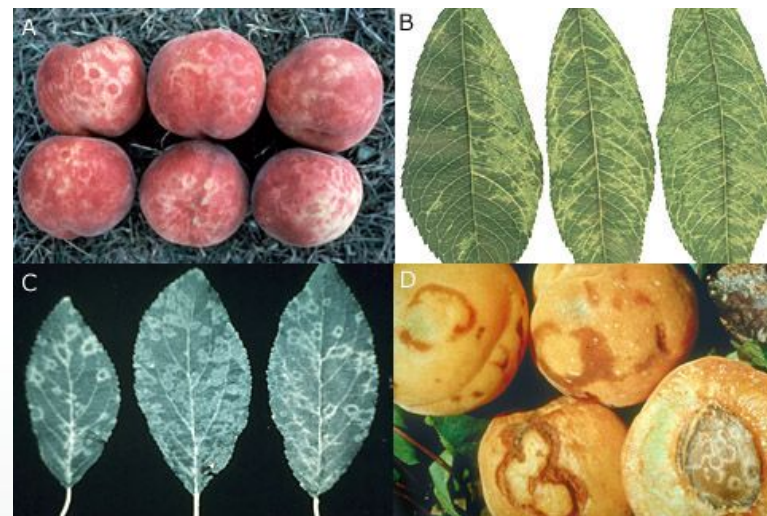
Візуальний метод

Для аналізу відбирають усі щуплі, недорозвинені та зморшкуваті насінини із зміненим забарвленням та різними плямистостями.

У разі, коли зразок складається із живих рослин або їх частин, в першу чергу звертають увагу на стан розвитку рослини та наявність симптомів штрихуватості (мозаїки), курчавості, карликовості, деформації, в'янення або некрозів.

Коли зразок складається з плодів, коренеплодів додатково зразки розрізають та оглядають на наявність внутрішніх некрозів, кільцевих плям.

Уражені або пошкодженні частини рослин з найбільш типовими зовнішніми ознаками хвороби відбирають для наступної ідентифікації.

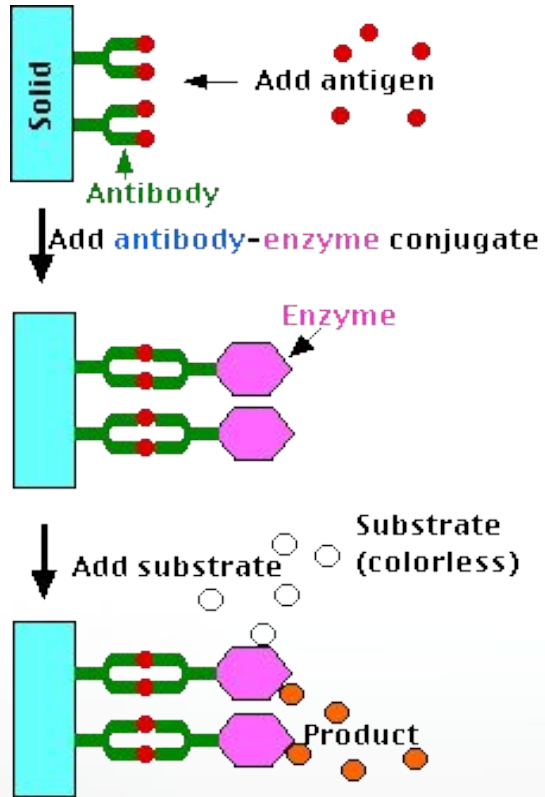


Імуноферментний аналіз

- Це серолігічний метод ідентифікації вірусів або бактерій, який ґрунтується на здатності ферментів, які використовуються для мітки антитіл, викликати кольорові реакції під час взаємодії з відповідним субстратом.



Схема проведення ІФА



На першому етапі інкубації поверхню пластикової мікротитрувальної плашки покривають антиген специфічними антитілами.

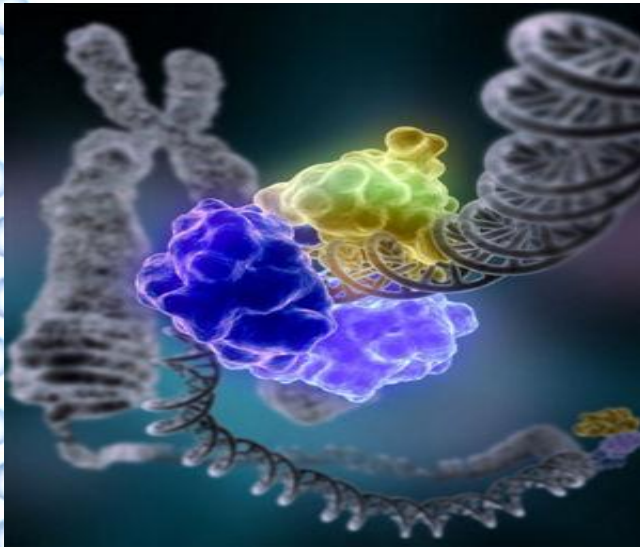
На другому інкубаційному етапі антигени зв'язуються з фіксованими антитілами формуючи комплекс антиген-антитіло.

На третьому етапі інкубації комплекс антиген-антитіло реагує з міченими антитілами утворюючи подвійний сендвіч антитіл.

Потім іде ферментна реакція, при якій наявність специфічного антигена проявляється позитивною кольоровою реакцією.

Ферментна реакція зчитується спеціальним приладом /зчитувач/ при 405 нм через одну і дві години.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)



Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР або PCR) — метод і спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів в біологічному матеріалі (пробі).

Метод заснований на багатократному виборчому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів (в штучних умовах). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка відповідає заданим умовам, і лише в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку.



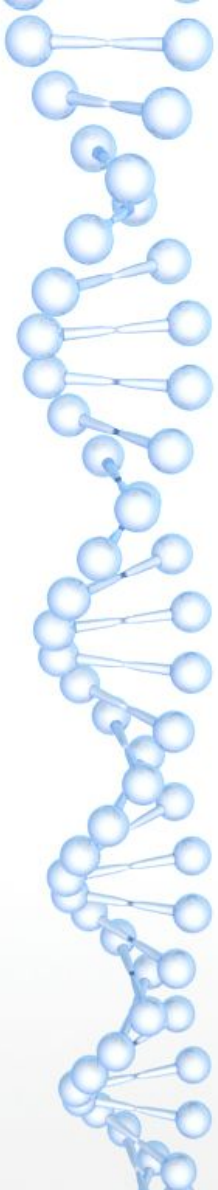
Основні переваги методу ПЛР

За короткий проміжок часу ПЛР-аналіз розповсюдився по всьому світі, перейшовши із лабораторій наукових закладів у лабораторії практичної діагностики.

ПЛР – метод, який імітує природну реплікацію ДНК і дозволяє знайти **єдину специфічну молекулу ДНК** в присутності мільйонів інших молекул.

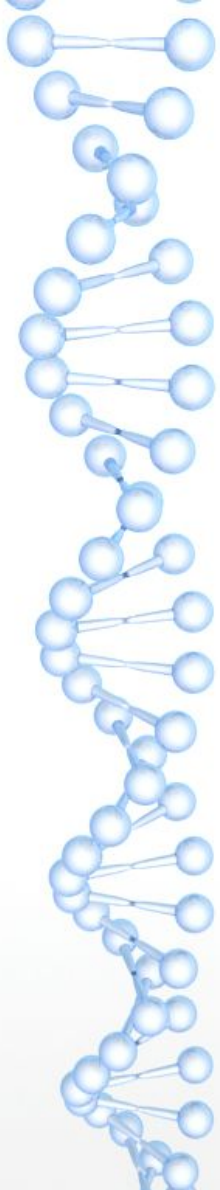
В порівнянні з іншими методами лабораторної діагностики ПЛР має ряд суттєвих переваг, а саме:

Пряме визначення наявності збудника. Традиційні методи діагностики (ІФА) виявляють білки-маркери (антитіла), які являються продуктами життєдіяльності інфекційних агентів, що дає опосередковане уявлення про наявність інфекції. Виявлення специфічної ділянки ДНК збудника методом ПЛР вказує на наявність збудника інфекції:



- Висока специфічність методу ПЛР зумовлена тим, що в досліджуваному матеріалі виявляється **унікальний, характерний саме для даного збудника фрагмент молекули ДНК**. Проведення ПЛР, на відміну від імуно-ферментного методу, виключає можливість отримання хибних результатів по причині перехресно-реагуючих антитіл;
- Висока чутливість методу ПЛР дозволяє виявляти навіть **поодинокі клітини** бактерій та вірусів. ПЛР-аналіз виявляє наявність збудників інфекційних захворювань в тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, мікробіологічними та ін.) це зробити неможливо. Чутливість ПЛР-аналізу складає 10-100 клітин у пробі (чутливість імунологічних методів 1000 – 100000 клітин).
- **Універсальність процедури виявлення різних збудників.** Метод базується на виявленні фрагменту ДНК чи РНК, якій являється специфічним для конкретного організму.

Швидкість отримання результатів. Для проведення ПЛР не



- Дякуємо на увагу!

