



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **138191** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
A01H 3/00
A01G 22/25 (2018.01)
G01N 1/28 (2006.01)
A01N 63/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

фй

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2019 04130</p> <p>(22) Дата подання заявки: 18.04.2019</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2019</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2019, Бюл.№ 22</p>	<p>(72) Винахідник(и): Зеля Аврелія Георгіївна (UA), Гунчак Володимир Михайлович (UA), Зеля Георгій Віорелович (UA), Янсе Лілія Амінівна (UA), Кушнір Олег Васильович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): УКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ КАРАНТИНУ РОСЛИН ІЗР НААН, с. Бояни, Новоселицький р-н, Чернівецька обл., 60321 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ПАТОТИПІВ РАКУ КАРТОПЛІ SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM (SCHILB) PERC. АНАЛІЗОМ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ФЕРМЕНТУ ПЕРОКСИДАЗИ

(57) Реферат:

Спосіб ідентифікації патотипів збудника раку картоплі *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Perc, що включає зараження тест сортів-диференціаторів картоплі відомими патотипами збудника раку і їх аналіз, згідно з корисною моделлю, зараження патотипами збудника раку здійснюють лише на одному стандартному сорті картоплі - Поліська рожева в лабораторних умовах, використовуючи літні зооспори, що містяться у свіжих ракових наростах, і їх аналіз, який проводять через 21 добу шляхом визначення активності пероксидази за інкубуванням 0,1 % розчином перекису водню та фарбуванням 0,05 % розчином бензидину за довжини хвилі 600 нм.

UA 138191 U

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, зокрема до виявлення структурних елементів мікроорганізмів з ґрунту, а саме для їх ідентифікації.

Відомий спосіб гістохімічної ідентифікації патотипів збудника раку картоплі, який оснований на забарвленні зооспорангіїв різних патотипів збудника хвороби флуоресціюючими барвниками [1].

Також відомий спосіб диференціації патотипів збудника раку картоплі у польових умовах за допомогою тест-сортів картоплі, які по різному вражаються патотипами або ізолятами збудника хвороби у вогнищах хвороби (прототип) [2].

Як найближчий аналог вибрано спосіб, при якому у вогнищах раку картоплі навесні, у квітні місяці, висаджують сорти-диференціатори картоплі: 1 група - сорти картоплі, які уражуються звичайним та всіма патотипами збудника раку: Поліська рожева, Лорх; 2 група - сорти картоплі, які уражуються лише агресивними патотипами збудника раку: Слов'янка, Пікуровська, Легенда; 3 група - сорти картоплі, які диференційовано уражуються патотипами збудника раку: Калинівська 11-м (Міжгірським); Малинська біла - 13-м (Рахівським); Щедрик - уражується 18-м (Ясінівським) та Диво і Червона рута - уражуються 22-м (Бистрецьким) агресивними патотипами збудника раку; 4 група - сорти картоплі, які не уражуються жодним патотипом збудника хвороби в Україні: Божедар та Глазурна [9].

У кінці вегетації проводять облік уражених тест-сортів картоплі, які диференційовано вражаються патотипами збудника раку картоплі.

За реакцією тест-сортів картоплі на зараження патогеном визначають, який патотип існує в даному вогнищі [2].

Згадані способи мають такі недоліки:

1. Вони є трудомісткими і їх використання пов'язане з затратою часу, який займає цілий вегетаційний період розвитку патогену та рослини-живителя;
2. Використовується багато сортів-диференціаторів картоплі.
3. Для їх проведення застосовуються барвники, які є високотоксичними сполуками;

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб біохімічної ідентифікації патотипів та ізолятів збудника раку картоплі, який може бути використаний Держпродспоживслужбою для ідентифікації патотипу у новому вогнищі хвороби.

Поставлена задача вирішується тим, що у запропонованому способі ідентифікацію патотипів проводять лабораторним способом шляхом зараження паростків стандартного сорту картоплі Поліська рожева, який вражається всіма відомими патотипами збудника раку картоплі, використовуючи літні зооспорангії, що містяться у свіжих ракових наростах, їх аналіз проводять через 21 добу, визначаючи активність окисно-відновних ферментів, серед яких найбільш чутливим є пероксидаза. Таким чином, патотипи збудника раку картоплі ідентифікуються за активністю пероксидази, що синтезується при ураженні рослини-живителя патогеном. Результат, що досягається внаслідок цього, має переваги, над іншими способами:

1. Запропонований спосіб дозволяє визначити невідомий патотип збудника раку картоплі за значно коротший термін часу (21 доба);
2. Для його проведення застосовуються сполуки, які є безпечними для здоров'я людини;
3. Суттєвою відмінністю нового способу є те, що використовується лише один сорт картоплі - стандарт, який вражається всіма патотипами або ізолятами збудника раку, і при дослідженні окисно-відновних ферментів, патотипи збудника раку картоплі ідентифікуються за активністю пероксидази, що синтезується при ураженні рослини-живителя патогеном.

Приклади здійснення способу.

Приклад 1. Навесні, у квітні місяці, у вогнищах патотипів раку висаджують по 10 бульб сортів-диференціаторів картоплі: Поліська рожева, Пікуровська, Слов'янка, Легенда, Щедрик, Диво, Червона рута, Божедар та Глазурна у трикратній повторності. Упродовж вегетаційного періоду проводять три обробки ґрунту.

У кінці вегетаційного періоду (серпень місяць) проводять облік уражених тест-сортів картоплі, у яких різна реакція на зараження патотипами збудника раку картоплі. Для цього їх викопують і підраховують уражені рослини та бульби картоплі. Також вимірюють розмір утворених ракових наростів.

У результаті ідентифікації патотипів за допомогою сортів-диференціаторів у вогнищах смт. Берегомет Вижницькою району Чернівецької області, де виявлено звичайний патотип збудника раку, уразився збудником лише сорт картоплі Поліська рожева (Фіг. 1). При зараженні 11-м (Міжгірським) агресивним патотипом (н. п. Майдан Міжгірського району Закарпатської області) з усіх тест-сортів уразились наступні: Поліська рожева, Пікуровська, Слов'янка, Легенда та Калинівська. У результаті ураження 13-м (Рахівським) агресивним патотипом (н. п. Сурупи Рахівського району Закарпатської області) уразились наступні сорти-диференціатори: Поліська

рожева, Пікуровська, Слов'янка, Легенда та Малинська біла. В результаті дії патогену з н. п. Ясіня Рахівського району Закарпатської області (18-й агресивний патотип) із сортів-диференціаторів уразились: Поліська рожева, Пікуровська, Слов'янка, Легенда та Щедрик. При зараженні сортів-диференціаторів в н. п. Бистрець Верховинського району Івано-Франківської області (22-й агресивний патотип) уразились сорти-диференціатори картоплі: Поліська рожева, Пікуровська, Слов'янка, Легенда, Диво та Червона рута. Сорти картоплі Божедар та Глазурна не уразились жодним патотипом збудника раку картоплі (таблиця 1).

Таблиця 1

Реакція тест-сортів картоплі на зараження патотипами збудника раку
Synchytrium endobioticum (Schilb) Perc. (польові досліді УкрНДСКР ІЗР, 2017-2018 р.).

№ п/п	Назва сорту-диференціатора	Патотипи				
		Д1 - звичайний	11- Міжгірський	13- Рахівський	18-Ясінівський	22- Бистрецький
1.	Поліська рожева	+	+	+	+	+
2.	Пікуровська	-	+	+	+	+
3.	Слов'янка	-	+	+	+	+
4.	Легенда	-	+	+	+	+
5.	Калинівська	-	+	-	-	-
6.	Малинська біла	-	-	+	-	-
7.	Щедрик	-	-	-	+	-
8.	Диво	-	-	-	-	+
9.	Червона рута	-	-	-	-	-
10.	Божедар	-	-	-	-	-
11.	Глазурна	-	-	-	-	-

+ - ураження тест-сортів картоплі;
 "- " - відсутність ураження тест-сортів картоплі.

10 За реакцією тест-сортів картоплі на зараження патогеном визначають, який патотип існує в даному вогнищі [2].

15 Приклад 2. Сприйнятливий до всіх патотипів збудника раку картоплі сорт Поліська рожева (стандарт) у лабораторних умовах заражали літніми зооспорами, які містяться у свіжих ракових наростах різних патотипів збудника хвороби: Д1 - звичайним патотипом, 11-м (Міжгірським), 13-м (Рахівським), 18-м (Ясінівським) та 22-м (Бистрецьким) агресивними патотипами [2].

20 Для цього, на верхівку бульби картоплі навколо паросткової частини закріплювали паперове кільце за допомогою суміші парафіну та вазеліну (1:1). В кільце наливали дистильовану воду і проводили інюкаляцію літніми зооспорами зі свіжих ракових наростів звичайного та 4-х агресивних патотипів збудника раку розміром 0,5 см³. Інокульовані зразки поміщали у клімокамеру з підвищеною вологістю та температурою повітря +11-13 °С на 21 добу до прояви симптомів захворювання [3].

25 Після проходження 21 доби з уражених паростків картоплі виділяли білки за методом Остерман Н.А. [4] шляхом розтирання на холоді у фарфоровій ступці з трис-фосфатним буфером (рН 7,8) та центрифугуванням упродовж 10 хвилин за 8000 об./хв. При цьому білки виділялися в супернатант (центрифугат), а суміші випадали в осад, який видаляли [3]. Супернатант використовували для визначення активності окисно-відновних ферментів, серед яких найбільш чутливим є пероксидаза, її називають ще "аварійним ферментом" [4], т. я. він реагує миттєво на будь-який чинник середовища: вологість, температуру, дію збудників хвороб. Визначення активності пероксидази проводили за методом Бояркіна А.М. [5]. Для визначення пероксидазної активності 1 мл екстракту інкубували із 1 мл 0,1 % розчину перекису водню (H₂O₂) та забарвлювали 0,05 % розчином бензидину впродовж 5-10 хвилин до появи блакитного забарвлення [4, 5, 6].

30 Активність пероксидази оснований на визначенні швидкості реакції окислення бензидину до утворення продукту окислення синього кольору певної концентрації при довжині хвилі 600 нм, яка попередньо встановлюється на спектрофотометрі СФ-46 Ломо:

A=EK/t, де:

A - активність ферменту (у мк/моль бензидину χ 100/хв.);

E - величина екстинкції;

K - коефіцієнт пропускання світла за 600 нм;

t - час інкубації ферменту з субстратом та прояви забарвлення.
 Математичну обробку даних проводили за Масловим Ю.І. [7].
 Результати досліджень представлені у таблиці 2 та фігурі.

Таблиця 2

Значення активності пероксидази у паростках стандартного сорту Поліська рожева, уражена різними патотипами збудника раку

№ п/п	Патотипи	Активність пероксидази, мк/моль (M±m)	
		неуражений	уражений
1.	Д1 (звичайний)	21,3±0,66	32,1±0,66
2.	11 (Міжгірський)	21,3±0,66	39,5±0,77
3.	13 (Рахівський)	21,3±0,66	46,8±0,33
4.	18 (Ясінівський)	21,3±0,66	69,1±0,77
5.	22 (Бистрецький)	21,3±0,66	53,4±0,33

5

У результаті проведених досліджень встановлено, що активність досліджуваного ферменту залежить від ступеня ураження паростків картоплі патотипами збудника раку. Активність пероксидази стандартного незараженого сорту Поліська рожева збудником хвороби склало 21,3±0,66. При ураженні звичайним (Д1) - далемським патотипом у сорту-стандарту Поліська рожева активність становила 32,1 Я),66 мк/мол; 11-м (Міжгірським) агресивним патотипом - 39,5±0,77 мк/мол; 13-м (Рахівським) - 46,8±0,33 мк/гмол, 18-м (Ясінівським) - 69,1±0,77 мк/мол, 22-м (Бистрецьким) - 53,4±0,33 мк/мол (таблиця 2, фігура). Таким чином, за активністю пероксидази, визначеної спектрофотометричним методом за довжини хвилі 600 нм, вдалось ідентифікувати існуючі патотипи раку картоплі.

10

15

Фіг. 2 - Активність пероксидази у паростках стандартного сорту картоплі Поліська рожева, уражена різними патотипами збудника раку

К - неуражений сорт картоплі (21,3±0,66 мк/мол);

Д1 - звичайний патотип (32,1±0,66 мк/мол);

11 - Міжгірський агресивний патотип (39,5±0,77 мк/мол);

20

13 - Рахівський агресивний патотип (46,8±0,33 мк/мол);

18 - Ясінівський агресивний патотип (69,1±0,77 мк/мол);

22 - Бистрецький агресивний патотип (53,4±0,33 мк/мол). Така закономірність спостерігалась щоразу після ураження стандартного сорту картоплі патотипами збудника раку.

25

Запропонований метод ідентифікації патотипів збудника раку картоплі підтверджує експериментальну перевірку, яка здійснювалась після ураження стандартного сорту картоплі Поліська рожева відомими патотипами з різних регіонів України.

Джерела інформації:

1. Долягин А.Б., Воловик А.С., Колесников В.А. та інш. О различиях между патотипами возбудителя рака картофеля //Защита растений. - 1985. - № 4. - С. 32.

30

2. Зеля А.Г., Мельник П.О. Методика дифференціації патотипів возбудителя рака картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Perc: //Методичні рекомендації. - Ч.: - Прут, 2010. - 58 с.

3. Остерман Н.А. Исследование биологических макромолекул электрофорезом, ультрацентрифугированием. - М.: - Наука, - 1983. - 304 с.

35

4. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. - М.: Наука, 1988. - 128 с.

5. Бояркин А.Н. Быстрый метод/и определения активности пероксидазы //Биохимия. - 1951. - 16, вып. 4. - С. 352.

6. Витол И.С. Мелик-Саркисов В.С., Аветисов В.Н. и др. Использование пероксидазы и глютомат дегидрогеназы в качестве биохимических маркеров в биотехнологических исследованиях на картофеле. //Доклады ВАСХНИЛ. 1989. - № 10. - С. 14-15.

40

7. Маслов Ю.И. Статистическая обработка данных биохимических исследований. //Методы биохимического анализа растений. - Л.: - Колос, 1978. - С. 163-178.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

45

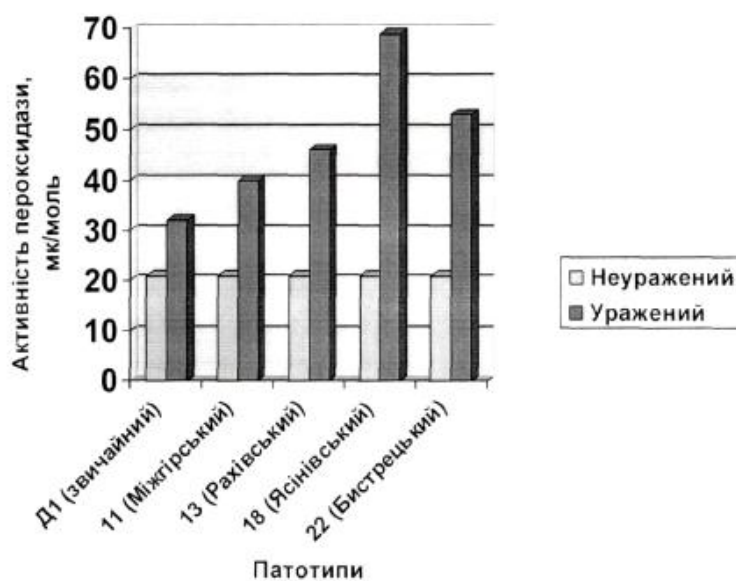
Спосіб ідентифікації патотипів збудника раку картоплі *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Perc, що включає зараження тест сортів-диференціаторів картоплі відомими патотипами збудника раку і їх аналіз, який **відрізняється** тим, що зараження патотипами збудника раку здійснюють лише на одному стандартному сорті картоплі - Поліська рожева в лабораторних умовах,

використовуючи літні зооспори, що містяться у свіжих ракових наростах, і їх аналіз, який проводять через 21 добу шляхом визначення активності пероксидази за інкубуванням 0,1 % розчином перекису водню та фарбуванням 0,05 % розчином бензидину за довжини хвилі 600 нм.



Фіг. 1

Сорт картоплі Поліська рожева, уражений звичайним патотипом збудника раку картоплі *Synchytrium endobioticum* (Schilb) Perc. у польових умовах



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601