

УКРАЇНЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ

На правах рукопису

КОЛОМІЄЦЬ Людмила Петрівна

ВІДАЛЕННЯ ШТАМІВ М-ВІРУСУ КАРТОПЛІ
ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ДІАГНОСТИКУМІВ

Спеціальність - 03.00.21. - фітопатологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

Дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Чернівці - 1995



00779386 (1)

АВ 33.735

Робота виконана в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН

Наукові керівники: кандидат біологічних наук
Ларіва Елеонора Іванівна

кандидат біологічних наук
Козар Федір Дзямович

Офіційні опоненти: Положенець Віктор Михайлович
доктор сільськогосподарських наук,
професор

Дулевич Ганетта Анатоліївна
кандидат біологічних наук, доцент

Провіана організація: Інститут картоплярства УААН

Захист дисертації відбудеться 12 січня 1996 р.
о 10 годині на засіданні Спеціалізованої ради А. 01. 05. 13
в Національному аграрному університеті (учбовий корпус 3,
аудиторія 68).

Просимо прийняти участь у засіданні Ради або прислати відгук
на автореферат у двох примірниках, завірений печатком, за адре-
сов 252041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, сектор захисту дисер-
тацій.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотечі Національного
аграрного університету.

Автореферат розісланий 11 грудня 1995 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої ради
кандидат
сільськогосподарських
наук, доцент

А. Г. Бабич

Загальна характеристика роботи

Актуальність проблеми. Картопля посідає одне з перших місць серед сільськогосподарських культур по різноманітності господарського використання. Велике економічне значення у зонах картоплярства мають втрати врохад внаслідок ураження вірусами, що складають на території держав США 15 - 20 мль т щорічно. Серед понад 20 вірусів, зареєстрованих на картоплі, М-вірус являється одним з найбільш широко розповсюджених та шкідливих патогенів цієї культури: обумовлені цим вірусом втрати врохад можуть досягати 70-75%, в зоні Поділля України складають у середньому 40.8%, у зворих рослин знижується також якість бульб.

Існуючі засоби боротьби не являються ефективними по відношенню до МВК, що значною мірою визначається неповнотою знань особливостей біології вірусу. У тому числі, недостатньо вивчення і штамовий склад цього патогену. ~~Тільки~~ як вивчення властивостей штамів вірусу має велике теоретичне та практичне значення: для успішної діагностики та ефективного контролю насінневого матеріалу; для оцінки вірусостійкості зразків на різних етапах селекційного процесу, що потребує також вивчення поширення вірусів та їх штамів у визначених природно-географічних зонах, чіткі критерії штаму потрібні при виявленні слабopatогенних штамів, які можуть використовуватись для профілактичної вакцинації сільськогосподарських рослин.

Ми провели дослідження ізолятів МВК, виявленіх з рослин картоплі у природних умовах Чернігівської області України (Поділля України).

Мета і завдання досліджень. Метод наших досліджень було вивчення розповсюдження в умовах Поділля України (Чернігівська область) штамів МВК та можливостей їх практичного використання.

Були визначені такі завдання :

- вивчити ступінь поширення та характер проявлення М-вірусу на картоплі різних сортів в умовах Чернігівської області України.

- відібрати в природних умовах ізоляти М-вірусу картоплі, вивчити їх властивості, виділити штамми різної патогенності;
- вивчити вакцинні властивості слабопатогенного штамму;
- виділити сильнопатогенні штамми з метою застосування у селекційній роботі;
- відпрацювати методи диференційної діагностики М- та S-вірусів картоплі;
- відпрацювати ефективний спосіб зберігання штамів кардавірусів картоплі.

Наукова новизна роботи. Вперше проведене дослідження штамового складу МБК в зоні Полісся України, в результаті порівняльного вивчення природних ізолятів вірусу виділені штамми різної патогенності.

При диференціюванні штамів МБК розроблені та застосовані такі методи: виділення моноліній вірусу насуванням через некроз на рослинах марі стійкої; проведення реакції перехресного захвату між штамми МБК на рослинах томату чілійського.

Встановлені вакцинні властивості слабопатогенного штамму МБК.

З застосуванням культивування інфікованих рослин картоплі в культурі *in vitro* створена колекція штамів та ізолятів кардавірусів картоплі (МБК та SBK), виділення в природних умовах Полісся України (Чернігівська область).

Практичне значення роботи. В результаті проведення досліджень утворена колекція штамів та ізолятів кардавірусів картоплі, зразки якої можуть використовуватись у науковій та практичній роботі.

Виділені та вивчені штамми кардавірусів картоплі, які запропоновані для виробництва діагностичних сироваток для виявлення МБК (Авт. свід-во № 1597389) та SBK (Авт. свід-во № 1571065), для оцінки вірусостійкості селекційного матеріалу (Авт. свідоцтво № 1554371).

Апробація роботи. Результати дисертації були представлені на VII мікробіологічному з'їзді України, на I Всесоюзному науково-практичному семінарі "Імунована стійкість с/госп. культур до фітопатогенів" (Ростов-на-Дону, 1989). Отримані дані щорічно докладались Вченій раді Інституту та включалися у звіти.

Особиста участь дисертанта. Дисертаційна робота виконана самостійно. Планування та проведення дослідів, обліки, спостереження, лабораторні роботи, математична обробка отриманих даних виконувались дисертантом особисто. Виробнича перевірка імуногенних штамів проводилась в лабораторії діагностичних сироваток Дослідного господарства Інституту. Обстеження посівів картоплі в Чернігівській області проводились у складі експедиції відділу фітовірусології Інституту.

На заміст виносяться такі основні положення: в результаті порівняльного вивчення виділених в природних умовах Поділля України ізолятів вірусу отримані штами НКВ різної патогенності, які запропоновані для використання при виробництві діагностичних сироваток та оцінці вірусостійкості селекційного матеріалу.

Структура роботи. Дисертація викладена на 146 сторінках машинопису, включає 28 таблиць, 17 малюнків, складається із вступу, огляду літератури, розділів експериментальної частини, висновків, списку цитованої літератури.

Публікація результатів досліджень. За матеріалами проведення досліджень видано 16 наукових публікацій.

Зміст роботи

Умови та методи досліджень

При виконанні роботи визначним матеріалом для виділення штамів НКВ служили ізоляти вірусу з рослин картоплі різних сортів, відібрані при обстеженні виробничих, насінницьких посівів та зразків на ділянках

сортовипробування в Чернігівській області України (зона Полісся). Був також використаний штам S4 SBK, виділений нами з рослини картоплі сорту Воротинська рання в даних природних умовах. Обстеження посадок картоплі, відбір ізолятів вірусів проводили згідно існуючим методичним рекомендаціям (Чумаков и др 1974; Ципленков, Щербинин, 1984).

Рослини, що використовували в роботі, вирощували: 1) в секційній теплиці (зимова-весняний період) - коливання температури 10-50° С, 5000-20000 лжкс; 2) в кліматичній камері - 16-час. тривалість світлового дня, 22-25° С, 15000 лжкс; 3) в вегетаційній кімнаті - 16-часова тривалість освітлення, 18 - 25° С, 2500 лжкс; 4) в польових умовах на ізольованій ділянці.

Інфікували рослини, використовуючи метод механічної інюкуляції та передачу попелицями.

Для виділення МВК з комплексної інфекції з ХБК та SBK використовували передачу попелицями *Myzodes persicae* Sulz. на рослини томату сорту *Petito*, імунні до SBK, а також, садіння бульб окремими частками.

Виділення штамів МВК проводили в узгодженні з існуючими методиками (Сузов, 1965; Кеттлвуд, 1973; Гіббс, Харрисон, 1978), а також застосовували розроблені нами для досліджуванних штамів МВК.

Для діагностики вірусів використовували візуальний, серологічний, індикаторний, електронномікроскопічний методи. Серологічне виявлення вірусів проводили методом крапельної аглютинації на склі (Дувін, Погова, 1937) з використанням антисироваток ІСГН УАН, а також проводили імуноферментний аналіз зразків (Clark, Adams, 1977) в варіантах "прямий" та "сенсаивч", використовуючи діагностичну МДУ.

На різних етапах роботи використовували 15 видів рослин-індикаторів. Накопичували МВК на рослинах томату (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сортів Перемога, Українець, Советский, *Petito*, *Rutgers*. SBK накопичували на томатах сорту Невський.

Для контролю матеріалу використовували електронну мікроскопію негативно контрастованих фосфорно-вольфрамовою кислотою нативних препаратів, виготовлених за методикою, модифікованою у відділі (Щербина и др., 1980).

Для електронномікроскопічного вивчення тканин інфікованої рослини використовували зразки, залиті в ЕПОН 812. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікромомі BS 490 А. Зрізи фарбували 1% водним розчином ураніацетату та розчином цитрату свинцю за методом Рейнолдса.

Подальшу довжину вірионів визначали, використовуючи негативно контрастовані нативні препарати соку листя рослини томату, інфікованих штамами МВК і ВТМ (стандарт). На основі вимірювання довжини вірусних часток при загальному збільшенні 100 тис. будували гістограми (Степаненко, Гордейчук, 1973; Степаненко, 1977).

Препарати досліджували в електронному мікроскопі МБ-100 и BS-540 при інструментальному збільшенні 15-40 тис.

Визначення властивостей вірусу в соці інфікованих рослин, серологічного титра вірусу в ураженій рослині проводили згідно прийнятих методик (Сухов, 1959).

Для порівняння патогенності штамів МВК застосували біохімічний метод визначення активності РНКаз в соці листя уражених рослин (Шакаговіч, 1974; Власов и др., 1981).

Антисироватки до МВК отримували з крові кролів. При отриманні штатно-специфічних сироваток вводили в ушну вену 1 мл чистого препарату вірусу при концентрації 300 мкг/мл 3-кратно з інтервалом 2 дні. При отриманні моноштамових сироваток вводили в ушну вену 3-кратно з інтервалом 2 дні по 1, 2, 3 мл препарату. Відбір крові починали через тиждень після останньої імунізації. Сироватку крові отримували по прийнятій методиці. Перевіряли специфічність та титр отриманих антисироваток проведенням реакції крапельної аглютинації з гомологічним та ге-

терологічними антигенами.

Чисті препарати вірусів отримували за відпрацьованою методикою (Николаєва та др., 1985). Контроль чистоти препаратів вірусу проводили, використовуючи серологічний, електронномікроскопічний, спектрофотометричний методи, а також електрофорез в ПААГ (Laemmli, 1970; 1973).

При проведенні польових дослідів, обліків та статистичної обробки результатів керувались методикою польового досвіду (Доспехов, 1985).

Результати та їх обговорення

Проведені нами багаторічні обстеження посівів картоплі в Чернігівській області свідчать про значну ураженість рослин МБК в природних умовах Полісся України. Ураженість виробничих посівів досягала 95-100%. При висаджуванні у польових умовах меристемних безвірусних рослин картоплі зараженість їх МБК вже в розсаднику випробування клонів становила 70.8%, а у розсаднику супер-супереліти - 21.4-100.0%, в залежності від сорту. Високою являється також зараженість МБК сортозразків на дільницях Держсортвипробування: ураженість 80% проаналізованих сортозразків становила 50-100%. МБК виявляється переважно у складі комплексних вірусних інфекцій. Сорти зарубіжної селекції в даних природних умовах також в значній мірі уражені вірусними хворобами. Порівняння результатів візуальних обліків та серодіагностики показало розповсюдження латентних інфекцій. В посівах картоплі на уражених рослинах МБК проявляється, головним чином, закручуванням листя верхівки, вираженим у різній мірі.

Для виділення штамів МБК використовували природні ізоляти вірусу, відібрані з рослин картоплі різних сортів, безсимптомних та виявивших симптоми захворювання. У 80% зібраних зразків МБК був виявлений у складі комплексних інфекцій, тому було проведено виділення ізолятів МБК у моноінфекції. Монолінії МБК були отримані пасуванням через некроз на

листі марі стінної з наступним накопиченням вірусу на рослинах томату, використовувачи відпрацьований нами спосіб (Авт. свид-во № 1565886).

Дослідили вплив виділень ізолятів МКВ на рослини картоплі та 11 видів тест-рослин. При зараженні локально реагуючих рослин досліджуваними ізолятами МКВ не виявили відмін в реакції таких видів рослин: *Gomphrena globosa* L., *Vigna sinensis* Endl., *Nicotiana debneyi* Donnl., *Chenopodium album* L., *Chenopodium quinoa* Willd. Більшість ізолятів МКВ викликали виникнення локальної реакції на листі марі стінної (2000 луск, 24° С, 16-год. тривалість освітлення). Відмінні спостерігалися у розмірі та кількості некрозів, а також, у продуктивності зараження від некроза.

При роботі з рослинами, які проявляють системну реакцію при зараженні МКВ, відмінні симптоми інфекції, залежні від ізоляту вірусу, виявлені при зараженні рослин пасліну полягачого та томату чілійського. Результати зараження цих рослин дозволяють говорити про патогенність досліджуваних ізолятів.

Проведені дослідження показали, що рослинами-індикаторами для діагностики виділень нами ізолятів МКВ являються марь біла, марь стінна, вігна початкова, дурман інаїський, паслін полягачий, томат чілійський. Для диференціювання ізолятів МКВ можуть бути використані рослини марі стінної, пасліну полягачого, томату чілійського. З використанням рослин-індикаторів було проведено попереднє групування досліджуваних ізолятів МКВ за ознакою патогенності.

Дослідження проявлення інфекції при механічній інокуляції рослин картоплі різними ізолятами МКВ показало, що в рік інокуляції МКВ був виявлений серологічно тільки в окремих рослинах. Симптоми, відмінні в залежності від ізоляту починали проявлятися в 1-й бульбовій репродукції інокульованих рослин, більш чи менш посилювались у наступних репродукціях. Картина розвитку інфекції, що викликають означені ізоляти

МВК на рослинах картоплі різних сортів загальною схожа: рослини картоплі залишалися безсимптомними носіями МВК або проявляли слабе закручування листя вершківки, зовні не відрізняючись від здорових; спостерігали слабку зморшкуватість листя; спостерігали сильне закручування листя; рослини проявляли курчавість, відставання в рості, яке посилювалось у пізніх репродукціях.

Встановлено відповідність між інтенсивністю симптомів, які викликають ізоляти МВК на тест-рослинах і рослинах картоплі.

Вивчення впливу на врожай картоплі 2-х ізолятів МВК різної патогенності показало, що в 4-х бульбових репродукціях картоплі сорту Прієкульська рання і 2-х бульбових репродукціях сорту Невська не відмічено зниження врожаїв, в порівнянні з контролем, рослин, заражених слабопатогенним ізолятом МВК 139, тоді як рослини, інфіковані сильнопатогенним ізолятом МВК 200, знижували врожай на 24,3-76,6% і 28,1-33,3%, відповідно.

Порівняльне вивчення властивостей досліджуваних ізолятів МВК показало схожість значень граничного розведення соку без втрати інфекційності, тривалості вистовування соку при кімнатній температурі, серологічного титру (в реакції крапельної аглютинації) в соці листя томату, хоч і можливо відмітити, що в більшій концентрації накопичуються слабо- і середньопатогенні ізоляти вірусу. Більшість випробуваних ізолятів інактивуються при температурі 70-73°C, 2 ізоляти - при 65-70°C.

Молекулярна довжина віріонів 2х ізолятів МВК з однаковим значенням ТТІ, але різної патогенності становила для слабопатогенного ізоляту МВК 139 680 нм, сильнопатогенного МВК 200- 640 нм.

Виявлені відмінності в імуногенності - антисироватки до патогенних ізолятів мали більш низький титр. Отримані антисироватки реагували з соком рослин, інфікованих різними ізолятами МВК, при аналізі крапельним методом, відрізняючись лише авідитетом.

Значні відмінні встановлені в ефективності передачі ізолятів МВК тлям *Nuzodes persicae* Sulz : зараженість рослин томату коливалась від 20.0% до 72.7%, в залежності від ізоляту вірусу.

Встановлено, що ступінь підвищення РНКазної активності в соці інфікованих патогенним МВК 200 рослин томату і картоплі була вище, в порівнянні з індукованою слабopatогенним МВК 139 : в соці рослин томату в динаміці розвитку інфекції - на 12.0-27.0% і 3.3-11.6%, відповідно, в соці рослин картоплі при хронічній інфекції - на 24.0-27.0% і 0.1-12%, відповідно. Таким чином тест порівняльного визначення рівня активності РНКаз в соці інфікованих рослин може служити при диференціюванні патогенності штамів МВК.

Встановлена захисна дія слабopatогенного МВК 139 проти сильнопатогенного МВК 200 з використанням розробленого нами способу проведення реакції перехрестного захисту на рослинах томату чілійського.

Таким чином, в результаті порівняльного дослідження виділених в природних умовах ізолятів вірусу отримані штами МВК різної патогенності. Критеріями ідентифікації штамів МВК явилися такі показники: значні відмінні біологічних властивостей, в тому числі - впливу на рослини картоплі, в значенні модальної довжини вірівів, імуногенності, ефективності передачі попелицями, встановлений також перехрестний захист. Характеристики патогенності штамів встановлені на основі симптомів, які вони індукують на рослинах-хозяях, а також, результатів біохімічного теста визначення активності РНКаз в соці інфікованих рослин.

З виділеними штамами МВК були проведені додаткові дослідження, орієнтовані на ті їх властивості, які могли б знайти практичне використання: МВК 139 - слабopatогенний штам, виявивший здатність до перехресного захисту по відношенню до сильнопатогенного; МВК 200 - сильнопатогенний штам, що проявляється різними симптомами на рослинах-індикаторах і рослинах картоплі та приводить до великих втрат урожаю; штам

МБК 35 - середньопатогенний, проявившии себе, як сильний імуноген.

Вивчали можливість застосування слабопатогенного штаму М 139 у захисті рослин картоплі від патогенних штамів МБК. Було встановлено, що рослини картоплі, інфіковані МБК 139, не виявляли симптомів, зовнішньо не відрізняючись від здорових в 6 бульбових репродукціях (строк спостереження). Протягом 5 бульбових репродукцій рослини картоплі сорту Прикульська равня, уражені М 139 давали в польових умовах врожай на рівні або вище контроль. Додаткові дослідження показали, що відмічене підвищення врожаїв є результатом зараження рослин контрольного варіанту при вирощуванні в полі МБК, штамами різної патогенності. Встановлена відсутність достовірної різниці врожаїв здорових рослин та уражених МБК 139 в 6-й бульбовій репродукції. Дослідження, проведені з використанням рослин-індикаторів та визначення рівня активності РНКаз в соці рослин картоплі сорту Прикульська равня 6-ої репродукції інфікованих МБК рослин, показали відповідність вірусу визначеним характеристикам штаму МБК 139 та його генетичну стабільність. Запису дії штаму МБК 139 проти середньопатогенного штаму МБК встановлено при проведенні реакції перезрелого запису на рослинах томату чілійського.

По результатах вивчення штам МБК 139 означений як вакцинний (Авт. свид-во № 1549226). Зараження штамом МБК 139 рослин картоплі сприяє збереженню більш високої врожайності на фоні природного ураження вірусами.

При дослідженні штаму МБК 200 встановлена його висока шкідливість на рослинах картоплі: зниження врожаїв картоплі сорту Прикульська равня в 2й бульбовій репродукції інюкульованих рослин становило 24.3%, в 3й-76.6%, картоплі сорту Невська в 1й бульбовій репродукції- 28.1%, в 2й бульбовій репродукції-33.3%. При зараженні сіяньців картоплі було встановлено, що симптоми захворювання проявляються на сіяньцях через 3 - 4 тижня після інюкуляції різким просвітленням жилки листя, потім спосте-

рігається закручування листя верхівки. МБК виявлений в рослинах, проявивши симптоми захворювання. Ефективність зараження сіянців відрізнялась для досліджених зразків, відображаючи ступінь їх стійкості до МБК 200. Деякі віаміни спостерігали в силі проявлення симптомів захворювання, тобто, у ступені толерантності зразка до МБК.

Штам МБК 200, який проявляє високу шкідливість на картоплі, має високу інфекційність при мезанічній інюкуляції (в контрольованих умовах), в експериментальних умовах проявляється на заражених рослинах картоплі вираженими симптомами, в заражених сіянцях легко виявляється серологічним методом на ранніх стадіях інфекційного процесу, запропонований для оцінки селекційного матеріалу на стійкість до МБК (Авт. свід-во № 1554371).

При порівняльному вивченні штамів МБК, виділених в природних умовах Чернігівської області України, штам МБК 35 проявив себе, як сильний імуноген. Використання МБК 35 як антигена дозволило отримати антисироватку більш високого титру та специфічності в порівнянні з іншими штамми МБК, що не давала реакції з виділеними в даних природних умовах ізолятами 1 штамми СВК. Штам запропонований для виробництва діагностичної сироватки для виявлення МБК (Авт. свід-во № 1597389).

По результатах порівняльного вивчення ізолятів СВК, відібраних у природних умовах Чернігівської області України був виділений штам S4 СВК з рослин картоплі сорту Воротніська рання. Вивчення цього штаму показало, що використання його, як антигена, дозволяє отримувати антисироватку високого титру (1:4096-1:8192 в реакції крапельної аглютинації), високої специфічності та активності. Штам S4 СВК запропонований для виробництва діагностичної сироватки до СВК (Авт. свід-во №1571065).

Дослідження, проведені з рослинами - індикаторами, показали можливість диференціальної діагностики виділених нами штамів МБК та СВК по реакції, яку вони викликають на рослинах марі стійної, марі ківоа, то-

нату чілійського (в умовах вегетаційної камери).

З використанням відпрацьованого нами способу підтримання вірусів вирошуванням інфікованих рослин в культурі in vitro утворена колекція штамів та ізолятів карпавірусів картоплі, виділених в природних умовах Чернігівської області України.

Висновки

1. Багаторічні обстеження посівів картоплі в Чернігівській області свідчать про значну ураженість рослин МБК в природних умовах Полісся України. Зараженість виробничих посівів досягала 95 - 100%. При вирощуванні в полі неристенних безвірусних рослин картоплі ураженість їх МБК в розсаднику с-супереліти становила 21.4 - 100.0%, в залежності від сорту. МБК виявлений в рослинах 98% зразків на Чернігівській дільниці Держсортвипробування, головним чином-у складі комплексних інфекцій. Сорти зарубіжної селекції в давніх природних умовах також в значній мірі заражені вірусними хворобами. В посадках картоплі на уражених рослинах МБК проявляється переважно закручуванням листя верхівки, вираженим в різній мірі. Встановлений високий ступінь ураженості картоплі МБК показує необхідність використання виділених в цій природно-географічній зоні штамів МБК для оцінки стійкості зразків на ранніх етапах селекційного процесу, та необхідність підвищення ефективності захисних заходів.

2. В результаті порівняльного дослідження виділених в природних умовах Полісся України ізолятів вірусу одержані штами МБК різної патогенності.

3. Ефективними критеріями при ідентифікації штамів МБК в проведених дослідженнях явилися такі показники : значні відміви біологічних властивостей, в тому числі, впливу на рослини картоплі, значенні молекулярної довжини віріона, імуногенності, ефективності передачі попелицями, вста-

новлений перехресний захист між штамами МВК. Характеристики патогенності штаму встановлені на основі даних про симптоми, які вони викликають на рослинах-хозяях, а також, по результатах біохімічного тесту визначення РНКазної активності в соці інфікованих рослин.

4. Встановлено, що при механічній інокуляції рослин картоплі різними штамами МВК симптоми починають проявлятися в їй бульбовій репродукції інокульованих рослин, більш чи менш посилюючись в наступних репродукціях. Відмітили, що картина розвитку інфекції, що викликають визначені штами МВК на рослинах картоплі різних сортів, загалом схожа, відрізняється тільки інтенсивністю в залежності від штаму вірусу. Виявлено відповідність між інтенсивністю симптомів, які індукують штами МВК на рослинах картоплі та тест-рослинах. В 4х бульбових репродукціях картоплі сорту Пржекульська рання і 2х бульбових репродукціях сорту Невська не відмітили зниження врожаю, в порівнянні з контролем, рослин, заражених слабopatогенним штамом МВК 139, тоді як рослини, інфіковані сильнопатогенним штамом МВК 200, знижували врожай на 24.3-76.6% і 28.1 - 33.3%, відповідно.

5. Показана схожість значень крапки граничного розведення, тривалості вистовування соку, серологічного титру (в реакції крапельної аглутинації) в соці листя томату, хоч і можливо відмітити, що в більшій концентрації накопичуються слабо- і середньopatогенні штами вірусу.

Значення крапки термічної інактивації для більшості досліджень ізольованих складало 70-73°C, для 2х - 65-70°C, виділені нами штами МВК мали значення ТТІ 70-73°C і відрізнялись патогенністю. Значення модальної довжини вірйону слабopatогенного штаму МВК 139 складало 680 нм, сильнопатогенного МВК 200 - 640 нм.

6. Виявлені відмінності в імуногенності - штамоспецифічні антисироватки, отримані до сильнопатогенних штамів МВК, в реакції крапельної аглутинації мали більш низький титр.

7. Встановлений перехресний захист слабобатогенного штаму НКВ 139 проти сильнобатогенного штаму НКВ 200.

8. При диференціюванні штамів НКВ розроблений спосіб клонування вірусу пасування через некроз на листі марі стійної, а також, спосіб проведення реакції перехресного захисту між штамми НКВ з використанням рослин томату чілійського.

9. По результатах вивчення властивостей слабобатогенний штам НКВ 139 означений як вакцинний (Авт. свід-во № 1549226). Зараження штамом НКВ 139 рослин картоплі, сприйнятливих до НКВ сортів, сприяє збереженню більш високої врожайності на фоні природного ураження вірусами.

10. Штам НКВ 200, який проявляє сильну шкідливість на картоплі, має високу інфекційність при механічній інокуляції (в контрольованих умовах), в експериментальних умовах проявляється на інфікованих рослинах картоплі чітко вираженими симптомами, в зараженні сіянців легко виявляється серологічним методом на ранніх стадіях інфекційного процесу, запропонований для оцінки стійкості до НКВ селекційного матеріалу (Авт. свід-во № 1554371).

11. Показано, що використання штаму НКВ 35, як антигена, дозволило отримати антисироватку більш високого титру та специфічності в порівнянні з іншими дослідженими штамми НКВ, яка не давала реакції з виділеними в даніх природних умовах ізолятами та штамми СВК. Штам НКВ 35 запропонований для виробництва діагностичної сироватки до НКВ (Авт. свід-во № 1597389).

12. По результатах порівняльного вивчення ізолятів СВК, відібраних в природних умовах Чернігівської області України був виділений штам S4 СВК з рослин картоплі сорту Воротинська рання. Використання як антигена штаму S4 СВК дозволило отримати антисироватку до вірусу з високим титром, специфічністю та активністю. Штам S4 СВК запропонований для

виробництва діагностичної сироватки для виявлення SBK (Авт. свід-во № 1571065).

13. Проведені дослідження показали, що для виявлення МБК можуть бути використані локально реагуючі рослини - індикатори марь біла, марь стінна, вігна початкова та системно реагуючі на зараження досліджуваними штамми та ізолятами МБК дурман Індійський, паслів полягавчий, томат чілійський.

Для диференціювання штамів і ізолятів МБК можуть бути використані рослини марі стінної, пасліна полягавчого, томату чілійського.

Показана можливість диференційної діагностики вивчаємих штамів МБК та SBK по реакції, що вони викликають на рослинах марі стінної, марі кіноа, томату чілійського.

14. Відпрацьований спосіб збереження і піддержання вірусів вирощування інфікованих рослин в культурі in vitro, утворена колекція штамів і ізолятів карлавірусів картоплі, виділених в природних умовах Поділля України (Чернігівська область).

Пропозиції виробництву

В результаті порівняльного дослідження виділень в природних умовах ізолятів вірусу були отримані штами МБК різної патогенності. По результатах вивчення властивостей штаму МБК 200, що проявляє сильну складність на картоплі, запропонований для використання при оцінці селекційного матеріалу на стійкість до М-вірусу (Авт. свід-во № 1554371). Штаму МБК 35 запропонований для виробництва діагностичної сироватки для виявлення МБК (Авт. свід-во № 1597389). Штаму S4 SBK запропонований для виробництва діагностичної сироватки для виявлення S- вірусу картоплі в уражених рослинах (Авт. свід-во № 1571065).

Публікації по темі дисертації

1. Щербина Н. В., Курбала М. Я., Коломиец Л. П.

ЛНБ ім. В. Стефанива
АН України

Метод приготування пре-

- паратом фитопатогенных вирусов для микроскопии // Тез. докл. V съезда микробиологического общества (Днепропетровск, 1980). - Киев, 1980. - с. 229.
2. Коломиец Л. П. К вопросу изучения штаммового состава М-вируса картофеля // Теория и практика использования иммунитета с/х культур к вирусным болезням. Тез. докл. VII Всес. совеш. - Вильнюс, 1984. - 235-237.
 3. Коломиец Л. П. Сравнительное изучение изолятов М-вируса картофеля методом растений-индикаторов // VI съезд Украинского микробиологического общества. Тез. докл. (Донецк, 1984). - Киев, 1984. - ч. 2. - с. 179.
 4. Коломиец Л. П. Штаммовый состав М-вируса картофеля в природных условиях Полесья УССР. // VIII Всес. совеш. по иммунитету с/х растений к болезням и вредителям. Тез. докл. (Рига, 1986). - ч. 11. - с. 26
 5. Коломиец Л. П. Штаммы М-вируса картофеля и их практическое использование // Использование достижений микробиологической науки в повышении эффективности земледелия. - К., 1989. - с. 84-87
 6. Козар Ф. Е., Сиверс Н. А., Коломиец Л. П. Вирусинадуцированная устойчивость картофеля к вирусным болезням // Индуцированная устойчивость с/х культур к фитопатогенам (научно-практич. семинар). Тез. докл. - Р-ва-Д., 1989. - с. 41
 7. Козар Ф. Е., Сиверс Н. А., Коломиец Л. П. Использование слабопатогенных штаммов вирусов для защиты картофеля от вирусных болезней // VII съезд Украинского микробиологического общества. Тез. докл. - Киев - Черновцы, 1989. - с. 176
 8. Шевель Н. Е., Погорилько Н. А., Коломиец Л. П., Зарицкий Н. М., Дмитрук Д. А. Вирусные болезни картофеля в Черниговской области УССР // VII съезд Украинского микробиологического общества. Тез. докл. - Киев - Черновцы, 1989. - с. 184-185.
 9. Шевель Н. Е., Козар Ф. Е., Сиверс Н. А., Коломиец Л. П., Дмитрук Д. А., Корчагина Н. А. Фітосанітарний стан посівів картоплі в Чернігівській області УРСР // 36. "Картоплярство". - 1991. - вив. 22. - 57-61

10. Коломиец Л. П., Козар Ф. Е., Лебедь Л. Н., Погорилько Н. А. Штамм М-вируса картофеля для производства диагностической сыворотки. Авт. свид. № 1597389, подано 29.07.88, опубл. 07.10.90. Бюлл. № 37 (51) 5 С 12 № 7/00, А 01 № 63/00.
11. Коломиец Л. П., Козар Ф. Е., Лебедь Л. Н., Погорилько Н. А. Штамм S-вируса картофеля для получения диагностических сывороток. Авт. свид.-во № 1571065, подано 01.08.88, опубл. 15.06.90. Бюлл. № 22 (51) 5 С 12 № 7/00.
12. Козар Ф. Е., Коломиец Л. П., Лебедь Л. Н. Штамм М-вируса картофеля для оценки сеянцев картофеля на вирусоустойчивость. Авт. свид.-во № 1554371, 10.05.88., опубл. 01.12.89. (51) 5 С 12 № 7/00, А 01 № 63/00
13. Козар Ф. Е., Коломиец Л. П. Штамм М-вируса картофеля для вакцинации растений картофеля. Авт. свид. № 1549226, 29.02.88., опубл. 08.11.89.
14. Коломиец Л. П., Козар Ф. Е. Способ выделения монолиний М - вируса картофеля. Авт. свид. № 1565886, 26.07.88., опубл. 22.01.90. (51) 5 С 12 №
15. Погорилько Н. А., Сиверс Н. А., Коломиец Л. П. Изучение иммуногенных свойств штаммов вирусов картофеля и томата и производство диагностической сыворотки к ним // Материалы науч. конфер., посвящен. 100 - летию со дня открытия вирусов Д. И. Ивановским. -Р-ва-Д., 1992. -с. 63-64
16. Козар Ф. Е., Сиверс Н. А., Коломиец Л. П. Изучение штаммов X- и М-вирусов картофеля на Украине и их практическое использование. // Материалы науч. конфер., посвящен. 100-летию со дня открытия вирусов Д. И. Ивановским. -Р-ва-Д., 1992. -с. 67-68.

Коломиец Л. П. Выделение штаммов М-вируса картофеля для производства диагностикумов.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 - фитопатология. Национальный аграрный университет. Киев, 1995.

Изложены результаты исследования штаммового состава М-вируса картофеля в зоне Полесья Украины. В результате сравнительного изучения природных изолятов вируса выделены штаммы разной патогенности.

Разработаны и применены методики клонирования вируса, постановки реакции перекрестной защиты между штаммами М-вируса, дифференциальной диагностики М- и S-вирусов картофеля с использованием растений-индикаторов, способ поддержания штаммов карлавирuсов с использованием культуры растений картофеля *in vitro*.

Установлены вакцинные свойства слабопатогенного штамма МВК, сильнопатогенный штамм предложен для использования для контроля вирусоустойчивости селекционного материала, высоко иммуногенные штаммы карлавирuсов картофеля предложены для производства диагностических сывороток.

Ключевые слова : карлавирuсы картофеля, М-вирус картофеля, S-вирус картофеля, штаммы, свойства, дифференцирование, диагностика, серодиагностика, вирусоустойчивость, вирусиндуцированная устойчивость.

Kolomietz L.P. Potato virus M strains selection for the diagnosticum production.

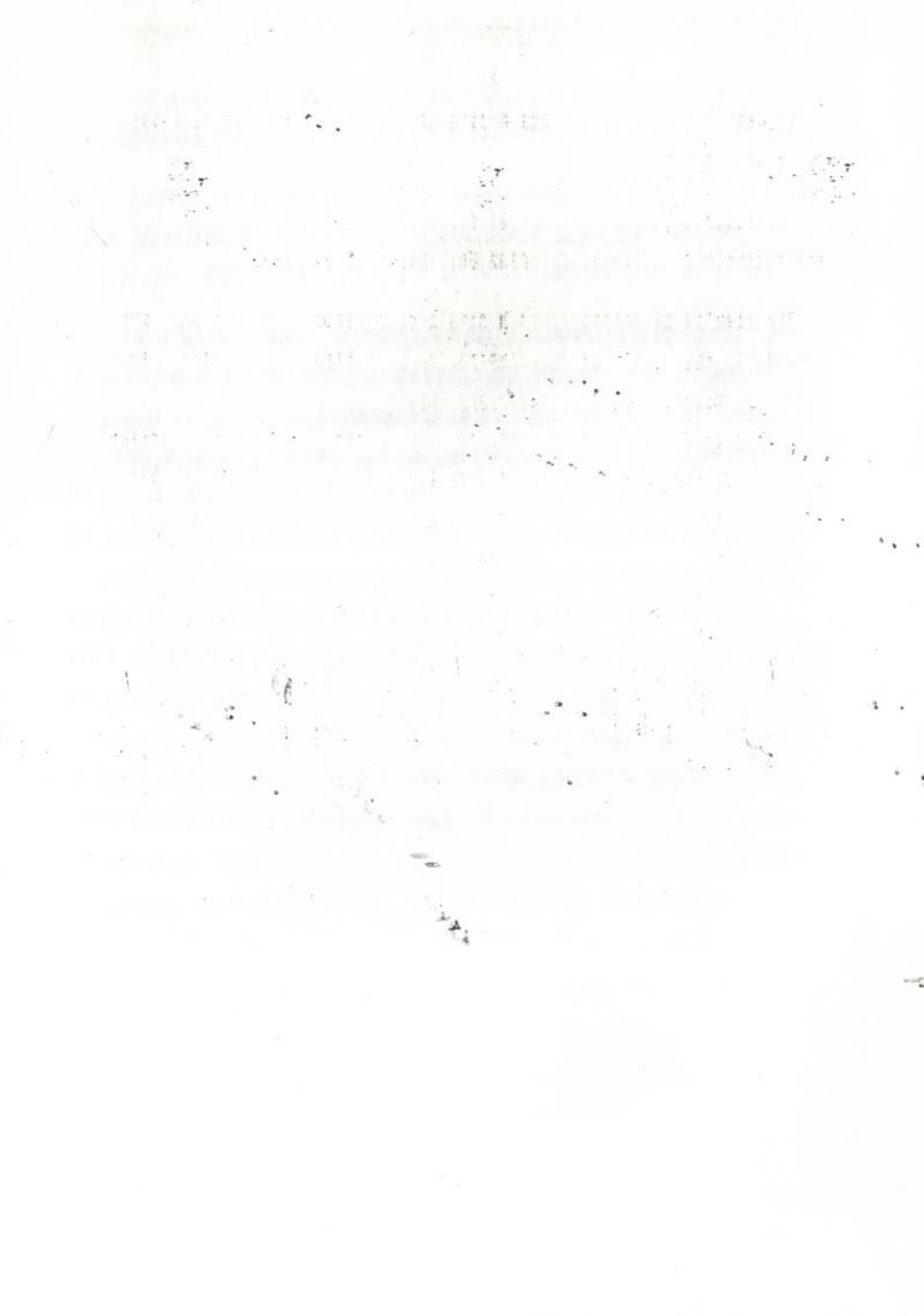
Candidate thesis in biological sciences on the speciality 03.00.21-Phytopathology. National Agrarian University. Kiev, 1995.

The results of potato virus M strain composition research are presented. In the result of the comparative investigation of nature isolates the potato virus M strains are obtained.

Methodes of the virus cloning, of the cross protection reaction leading, of the carlaviruses differential diagnostic with test-plant using and of the potato carlavirus strains preservation with plant tissue using had been developed and used.

The vaccin properties of the potato virus M slightpathogenic strain are established, the pathogenic strain is proposed for selective material valuation, the immunogenic strains of potato carlaviruses are proposed for the diagnostic antiserum production.

Key wordes : potato carlaviruses, potato virus M, potato virus S, strains, properties, differentiation, diagnostic, resistance, virus-induced resistance.



Handwritten text at the top of the page, possibly a name or title, which is mostly illegible due to fading and blurring.

453166

AB 33.735