



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **72957** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A01H 15/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

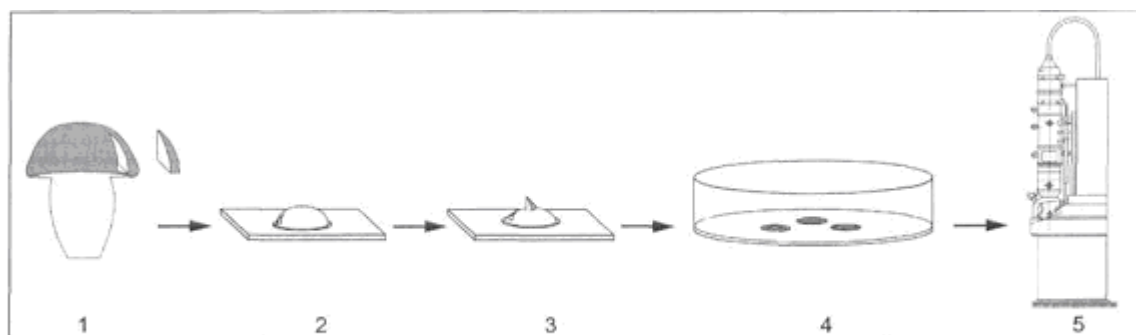
(21) Номер заявки: u 2011 14539	(72) Винахідник(и): Мельничук Максим Дмитрович (UA), Бойко Ольга Анатоліївна (UA), Дубровін Валерій Олександрович (UA), Бойко Анатолій Леонідович (UA), Мироненко Валентин Григорович (UA), Бойко Анастасія Андріївна (UA), Клюваденко Андрій Андрійович (UA), Дрозд Петро Юрійович (UA), Ліханов Артур Федорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 07.12.2011	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.09.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2012, Бюл.№ 17	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ, вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, 03041 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ПАТОГЕНІВ У ШАПИНКОВИХ ГРИБІВ (BASIDIOMICETES)

(57) Реферат:

Спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (Basidiomycetes), при якому при приготуванні препарату з міцелію його шар в 2-4 мм змішують з фосфорно-вольфрамовою кислотою (ФВК) при РН 5,5-6,5 і контрастують підготовану суміш з експозицією в 150-180 секунд, наносять на сітку-підкладку, підсушують і фотографують на електронному мікроскопі; оцінку за зовнішніми ознаками проводять на основі зображень (фотографій) контрастованого препарату міцелію; а при приготуванні препарату з плодового тіла гриба відбирають пробу з шапинки плодового тіла гриба у формі трикутника зі стороною 2,5-3,0 мм з її подальшим контрастуванням у ФВК при РН 5,5-6,5 і експозицією в 90-180 секунд, наносячи суміш на сітку-підкладку - підсушують, а остаточну оцінку контрастованого препарату з плодового тіла гриба за зовнішніми ознаками проводять на основі його зображень (фотографій); при цьому такі структурно-морфологічні об'єкти як бактерії, мікроскопічні гриби й віруси виявляють комплексно в одному препараті й за короткий час; окрім того бактерії, їх фаги (віруси), мікроскопічні гриби та їх фрагменти (органели) в препаратах з міцелію (плодового тіла) шапинкових грибів (Basidiomycetes) виявляють і фіксують на зображеннях із збільшенням в 10000-25000 разів, а віруси паличкоподібної, бацилоподібної й ізометричної форми виявляють і фотографують при збільшенні в 25000-45000 разів.

UA 72957 U



Фиг. 1.

Корисна модель належить до технології експрес-діагностики патогенів різної природи у шапинкових грибів і є універсальною для застосування в аграрній, мікробіологічній, фармацевтичній, харчовій та інших галузях господарювання. Запропонований спосіб може бути використаний наприклад при вирощуванні їстівних грибів печериці, гливи звичайної, інших видів

грибів та контролю біологічного міцелію, який є вихідним посівним матеріалом для шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) та грибів других таксономічних груп.

Відомий спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*), що включає приготування препарату з плодового тіла гриба та його оцінку за зовнішніми ознаками, передбачає довготривале тестування патогенів та їх ідентифікацію у їстівних і лікарських грибів і потребує значних затрат на виділення, очистку, підбір середовища, виготовлення препаратів для різних типів мікроскопування, розробку системи діагностичних тестів для вірусів, бактерій, мікроскопічних грибів. Всі ці затрати зводяться до вирішення основної задачі - налагодження технологій вирощування грибів на здоровій основі з покращенням їх якості та підвищенням врожайності. Використання висіву бактерій та мікроскопічних грибів на підібрані поживні середовища з подальшою ідентифікацією збудників. Цей спосіб дає позитивні результати при умові застосування повного комплексу діагностичних методів ідентифікації збудників хвороб, яких відомо більше 15-ти. Довготривалість такого способу виявлення патогенів робить його неефективним при промисловому вирощуванні різних видів грибів.

Найближчим до заявленого є відомий спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*), який включає приготування препарату з гриба (міцелію) та його оцінку за зовнішніми ознаками, зокрема за габітусом об'єкта, в основному при появі симптомів хвороби у грибів за відповідних технологічних циклів їх вирощування у лабораторних умовах, в спеціалізованих приміщеннях (трансформованому середовищі) чи у відкритому ґрунті. Така оцінка міцелію і плодових тіл дає змогу виявити тільки ті хвороби, які викликають патогени різної природи у вигляді загальмованого росту плодових тіл з утворенням бурих та чорних плям, водянистості та із сильною деформацією форми тіла грибів. За цих умов важко провести диференціацію симптомів до відповідного збудника хвороби, та зовсім випадає виявлення (контамінація) латентної інфекції грибів. Цей спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) достовірно демонструє загальний інфекційний процес у грибів. Проте така сукупність ознак способу є явно недостатньою для оцінки грибів на ураження їх певними збудниками хвороб. Тому цей спосіб вимагає докорінного удосконалення. Поза межами оцінки за способом-прототипом залишаються позиції латентної інфекції, морфологічних ознак патогенів хвороб, які здатні до контамінації грибів в комплексі або ж викликають патологічний процес роздільно. Крім того, спосіб передбачає виявлення інфекційних хвороб фактично під час кінцевого періоду онтогенезу, коли уже нанесено значні збитки урожайності та якості грибної продукції.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) з метою підвищення ефективності здійснення контролю біологічного міцелію та експрес-діагностики патогенів різної природи у шапинкових грибів при їх вирощуванні.

Задача вирішується завдяки тому, що в способі виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*), що включає приготування препарату з міцелію (плодового тіла) та його оцінку за зовнішніми ознаками, при приготуванні препарату з міцелію його шар в 2-4 мм змішують з фосфорно-вольфрамовою кислотою (ФВК) при РН 5,5-6,5 і контрастують підготовану суміш з експозицією в 150-180 секунд, а потім наносять на сітку-підкладку, підсушують і фотографують на електронному мікроскопі; нарешті оцінку за зовнішніми ознаками проводять на основі зображень (фотографій) контрастованого препарату міцелію; а при приготуванні препарату з плодового тіла гриба відбирають пробу з шапинки плодового тіла гриба у формі трикутника зі стороною 2,5...3,0 мм з її подальшим контрастуванням у ФВК при РН 5,5-6,5 і експозицією в 90-180 секунд, потім суміш наносять на сітку-підкладку, підсушують, а остаточну оцінку контрастованого препарату з плодового тіла гриба за зовнішніми ознаками проводять на основі його зображень (фотографій); при цьому такі структурно-морфологічні об'єкти як бактерії, мікроскопічні гриби й віруси виявляють комплексно в одному препараті й за короткий час; окрім того бактерії, їх фаги (віруси), мікроскопічні гриби та їх фрагменти (органели) в препаратах з міцелію (плодового тіла) шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) виявляють і фіксують на зображеннях із збільшенням в 10000-25000 разів, а віруси паличкоподібної, бацилоподібної й ізометричної форми виявляють і фотографують при збільшенні в 25000-45000 разів.

Те, що при приготуванні препарату з міцелію його шар змішують з фосфорно-вольфрамовою кислотою (ФВК), контрастують підготовану суміш, наносять її на сітку-підкладку, підсушують і фотографують на електронному мікроскопі та роблять оцінку за зовнішніми

ознаками на основі зображень контрастованого препарату міцелію чи плодового тіла гриба дозволяє створити ефективну комбінацію контрольних дій щодо оцінки стану шапинкових грибів (Basidiomycetes) з виявленням вірусів паличкоподібної, бацилоподібної й ізометричної форми комплексно в одному препараті й за короткий час, і що не може бути здійснене за іншої сукупності й взаємодії суттєвих ознак цього способу.

Тобто, удосконалення способу виявлення патогенів у шапинкових грибів (Basidiomycetes) дозволяє підвищити продуктивність грибів за рахунок вчасної оцінки ураженості патогенами і одночасно знизити інфекційний процес шляхом введення нових біотехнологічних рішень й обмежень та ефективним застосуванням у складі комплексу заходів у взаємодії суттєвих ознак нового способу.

Спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (Basidiomycetes) стимуляції виконується наступним чином. При приготуванні препарату з міцелію його шар в 2-4 мм змішують з фосфорно-вольфрамовою кислотою (ФВК) при РН 5,5-6,5 і контрастують підготовану суміш з експозицією в 150-180 секунд, а потім наносять на сітку-підкладку, підсушують і фотографують на електронному мікроскопі; нарешті оцінку за зовнішніми ознаками проводять на основі зображень (фотографій) контрастованого препарату міцелію. При приготуванні препарату з плодового тіла гриба відбирають пробу з шапинки плодового тіла гриба у формі трикутника зі стороною 2,5...3,0 мм з її подальшим контрастуванням у ФВК при РН 5,5-6,5 і експозицією в 90-180 секунд, потім суміш наносять на сітку-підкладку, підсушують. Остаточну оцінку контрастованого препарату з плодового тіла гриба за зовнішніми ознаками проводять на основі його зображень (фотографій). Такі структурно-морфологічні об'єкти як бактерії, мікроскопічні гриби й віруси виявляють комплексно в одному препараті й за короткий час. Окрім того бактерії, їх фаги (віруси), мікроскопічні гриби та їх фрагменти (органели) в препаратах з міцелію (плодового тіла) шапинкових грибів (Basidiomycetes) виявляють і фіксують на зображеннях із збільшенням в 10000-25000 разів, а віруси паличкоподібної, бацилоподібної й ізометричної форми - при збільшенні в 25000-45000 разів.

Таке технологічне рішення створює умови швидкого виявлення збудників захворювань у грибів. Приклад виконання способу при підготовці та дослідженнях препарату із плодових тіл схематично представлено на фігурі 1, де: 1 - плодове тіло (вичленення матеріалу), 2 - ФВК на сітці-підкладці, 3 - занурення об'єкта в ФВК, 4 - підсушування препарату в чашці Петрі, 5 - дослідження об'єкта в електронному мікроскопі.

Зокрема (фіг. 1), лезом проводяться надрізи шапинки у формі трикутника (кожна сторона якого складає 2,5...3,0 мм) з послідовним контрастуванням об'єкта у краплі ФВК при РН 5,5-6,5, яка попередньо нанесена на сітку з підкладкою для електронного мікроскопічного дослідження. Експозиція зануреного в краплі ФВК об'єкта становить 90-180 секунд, після чого підсушений у чашці Петрі препарат проглядають в електронному мікроскопі з початковим інструментальним збільшенням у ~ 10 000 раз і наступним доведенням його до 25 000-45 000 разів. Після чого, при збільшенні в 10 000-25 000 разів фотографують бактерії та їх фаги (віруси), мікроскопічні гриби та їх фрагменти (органели). За умов збільшення приладу (25 000-45 000) фотографуються віруси паличкоподібної, бацилоподібної, ізометричної форми. В цьому варіанті для контрастування використовують інші відомі солі важких металів (уранілацетат та ін). Останні доцільно вживати для віково старших грибів, що мають більш жорсткі шапинки і ніжки.

Приклад виконання способу при підготовці та дослідженнях препарату із міцелію подано на фіг. 2, де: 6 - чашка Петрі з міцелієм, заглибленим у контрастер (ФВК), 7 - нанесення об'єкта на сітку-підкладку, 8 - підсушування препарату, 9 - дослідження проби в електронному мікроскопі. Для цього у чашці Петрі в шару міцелію скляним пробійником діаметром ~ 3...4 мм на ½ глибини формується комірка, яка заповнюється 2-3 краплями ФВК, злегка розмішується скляним шпателем протягом ~ 150...180 сек., суміш наносять на сітку-підкладку, підсушують та проглядають в електронному мікроскопі.

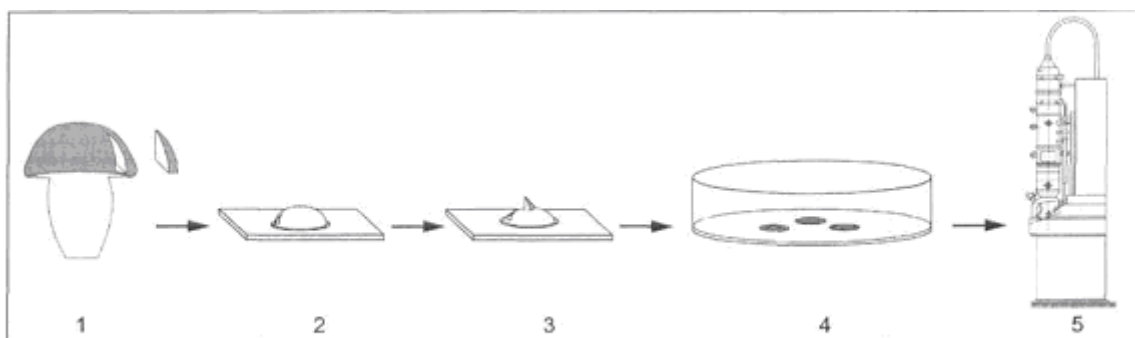
При реалізації способу у випадку з плодовими тілами гриба (фіг. 1) добре проглядаються паличкоподібні, бацилоподібні частки, хвостові відростки бактеріофагів, фрагменти та органели мікроскопічних грибів, бактерії. За таких умов біля 65...70 % поверхні сітки-підкладки залишається без додаткових низькомолекулярних компонентів (забруднювачів), що дає змогу при відповідному інструментальному збільшенні мікроскопу надійно досліджувати окремі та сумарні об'єкти.

Реалізація способу з міцелієм (фіг. 2) дає змогу досліджувати об'єкти - патогени в гомогенаті, підбираючи відповідні поля зору для спостереження.

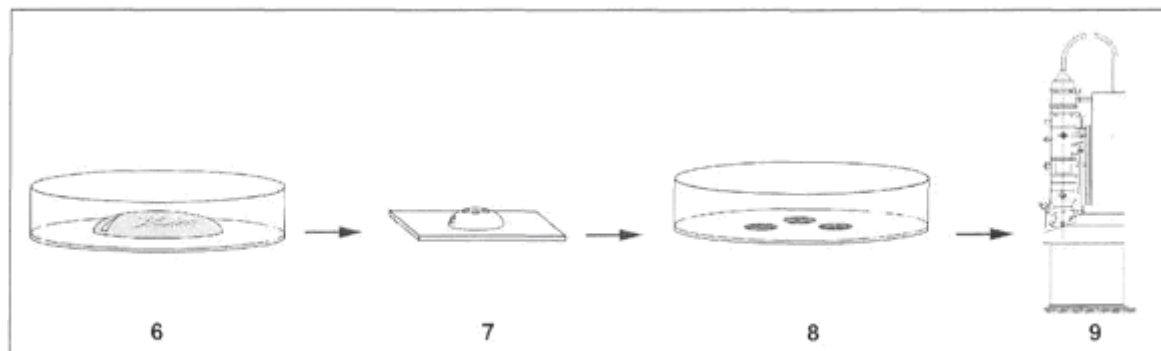
Таким чином, реалізація корисної моделі не потребує значних затрат для її виконання. Вона виконується в експрес-режимі і може бути ефективно використана в грибовництві.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб виявлення патогенів у шапинкових грибів (*Basidiomycetes*), що включає приготування препарату з міцелію (плодового тіла) та його оцінку за зовнішніми ознаками, який **відрізняється**
- 5 тим, що при приготуванні препарату з міцелію його шар в 2-4 мм змішують з фосфорно-вольфрамовою кислотою (ФВК) при РН 5,5-6,5 і контрастують підготовану суміш з експозицією в 150-180 секунд, наносять на сітку-підкладку, підсушують і фотографують на електронному мікроскопі; оцінку за зовнішніми ознаками проводять на основі зображень (фотографій)
- 10 контрастованого препарату міцелію; а при приготуванні препарату з плодового тіла гриба відбирають пробу з шапинки плодового тіла гриба у формі трикутника зі стороною 2,5-3,0 мм з її подальшим контрастуванням у ФВК при РН 5,5-6,5 і експозицією в 90-180 секунд, наносячи суміш на сітку-підкладку - підсушують, а остаточну оцінку контрастованого препарату з плодового тіла гриба за зовнішніми ознаками проводять на основі його зображень (фотографій);
- 15 при цьому такі структурно-морфологічні об'єкти як бактерії, мікроскопічні гриби й віруси виявляють комплексно в одному препараті й за короткий час; окрім того бактерії, їх фаги (віруси), мікроскопічні гриби та їх фрагменти (органели) в препаратах з міцелію (плодового тіла) шапинкових грибів (*Basidiomycetes*) виявляють і фіксують на зображеннях із збільшенням в 10000-25000 разів, а віруси паличкоподібної, бацилоподібної й ізометричної форми виявляють і фотографують при збільшенні в 25000-45000 разів.



Фіг. 1.



Фіг. 2.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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