

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
НАО «Национальный аграрный научно-образовательный центр»
ТОО «КАЗАХСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ И КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ» им. Ж. Жиёмбаева

**ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ТОМАТА И В ТОМ ЧИСЛЕ ВИРУС
КОРИЧНЕВОЙ МОРЩИНОСТОСТИ ПЛОДОВ ТОМАТА (TOBRFV)
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИИ ТОМАТА**

Направление: Карантин и защита растений

Дата проведения: 12 октября 2022 года

Председатель Правления
ТОО «КазНИИЗиКР им. Ж. Жиёмбаева

Дуйсембеков Б.А.

Лектор

Турбекова Шырын



Факторы влияющие на практическое применение метода

СТОИМОСТЬ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

быстрота

доступность инструментов

этап заболевания

**Молекулярные
методы**

**Методы секвенирования
следующего поколения**

**Визуальный и
микроскопический
метод**

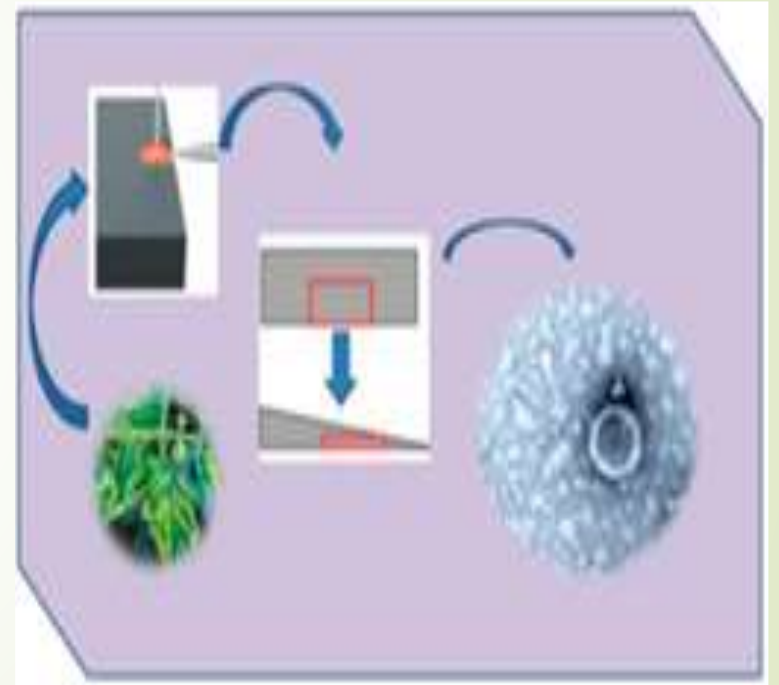
**Методы диагностики
вирусных заболеваний
томата**

**Серологические
методы**

**Метод растений-
индикаторов**

Визуальный и микроскопический метод

- задержка роста;
- изменение окраски различных органов;
- изменение формы и размеров органов;
- поражения некротического типа.



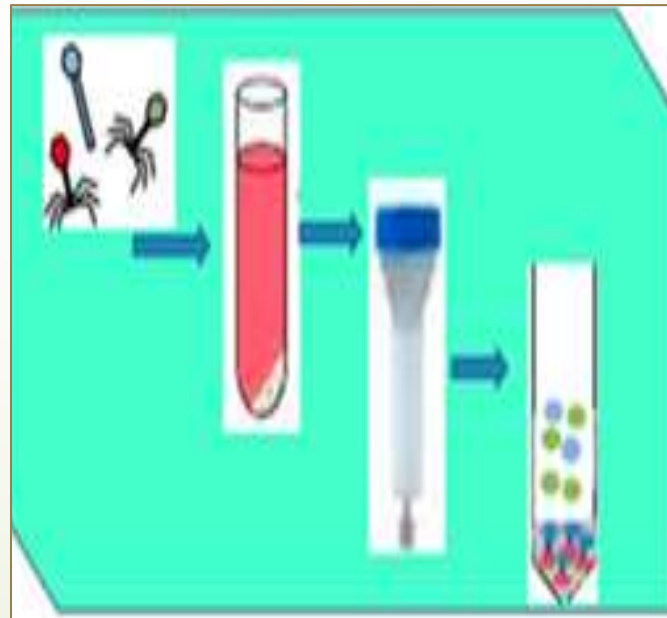
Микроскопический метод

- ▶ При диагностике фито вирусов необходимо определить форму и размер вирионов, для чего следует, как показали исследования ряда авторов, измерить не менее 100 вирусных частиц. Распределяя затем размеры вирионов по классам, определяют величину, наиболее часто встречающуюся, которую принимают за типичные размеры исследуемого вируса. При приготовлении вирусных препаратов в качестве предметных стекол, на которые обычно помещают объект исследования, используются специальные сетки диаметром 2-3 мм (в зависимости от типа микроскопа), покрытые пленкой-подложкой из коллодия, препараты готовят методами погружения, разбавленной суспензии, приготовления препаратов лабильных вирусов.



Метод растений-индикаторов

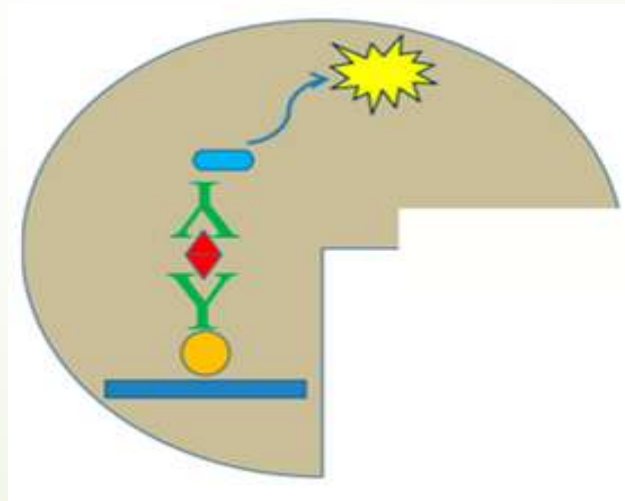
Индикаторным называют растение, которое дает четкую и типичную реакцию на заражение возбудителем, сравнительно легко отличимую от реакции этого же вида растения на другие патогены.



Серологические методы

Методов серодиагностики основаны на иммуногенных и антигенных свойствах возбудителей, имеющих белок, и позволяют установить вид патогена, определить концентрацию и локализацию возбудителя в клетках и тканях растений.

Наиболее экономичным и распространенным методом выявления и идентификации вирусов является иммуноферментный анализ (ИФА). В настоящее время доступны коммерческие наборы ИФА, однако эти наборы не являются вид специфичными для ToBRFV из-за перекрестной реакции с другими тобамовирусами.





Серологические методы



Капельный метод.



Энзимосвязанный
иммуносорбентный
тест (ELISA-тест,
ИФА)



Экспресс-метод
ИФА
(иммунострипы)

Капельный метод



* первая капля во втором ряду с образованием хлопьевидного осадка свидетельствует о наличии в образце вируса, специфичного к данной антисыворотке

Энзимосвязанный иммуносорбентный тест (ELISA)

- антитела, специфичные для возбудителя TOBRFV

адсорбируются на специальных пластиковых пластинах с углублениями-колодцами (0,5 мм). С этой целью в колодцы добавляют раствор у-глобулиновой фракции антисыворотки

- после инкубирования не адсорбированные антитела отмывают и затем добавляют сок больного растения. Если вирус присутствует в соке, он будет реагировать с адсорбированными антителами и, таким образом, связываться с пластинкой

- затем в колодцы добавляют раствор, содержащий антитела, связанные с ферментом. Если вирус находится в колодце, то он связывается с ферментом. При промывании удаляется несвязанный конъюгат и в колодец добавляют ферментный субстрат

После инкубационного периода измеряют активность фермента. Количество гидролизата прямо пропорционально количеству возбудителя. Интенсивность окраски также пропорциональна концентрации вируса

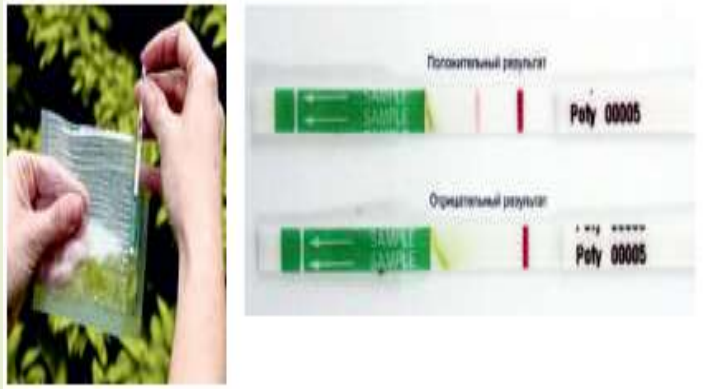


Экспресс-метод ИФА (иммунострипы)

Алгоритм диагностики включает в себя:

выделение сока из части
листа (0,15 г) томата в
емкость;

погружение иммунострипа на
0,5 см до метки «sample» в
сок;

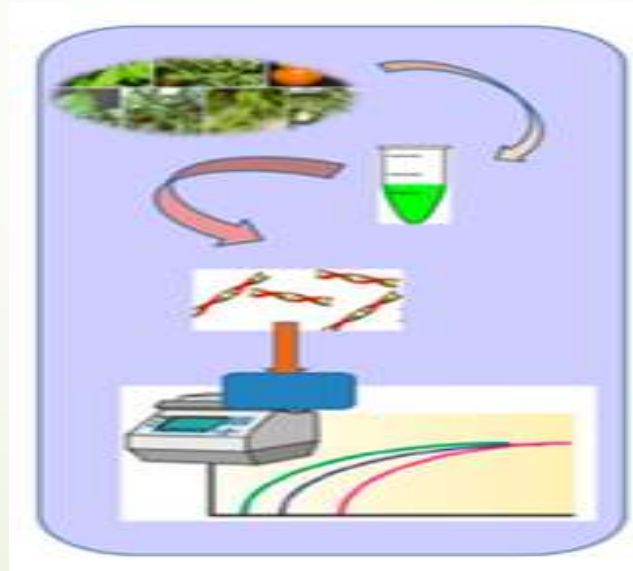


По мере выполнения теста
появляются одна или две
полоски, указывающие
соответственно на
отрицательный или
положительный результат

ожидание результата в
течение 5-30 мин.

Молекулярно-генетические методы

Из-за более высокой чувствительности нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) получили широкое распространение в области диагностики вирусов. Для выявления ToBRFV в семенах, а также в симптоматичных и бессимптомных растениях или плодах применяют ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием универсальных или видоспецифичных праймеров для ToBRFV



Молекулярно-генетические методы

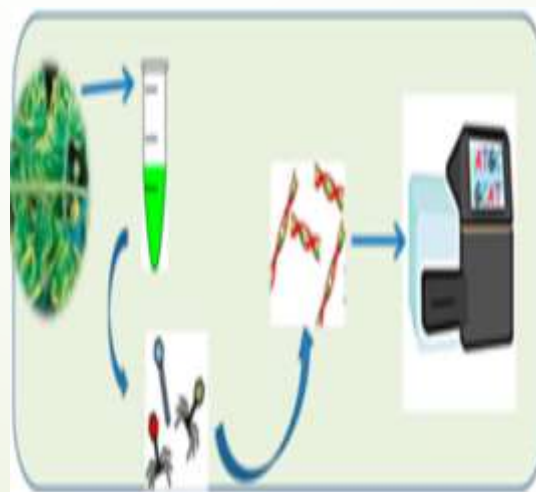
В современных условиях для диагностики патогенов все более широко и успешно используются молекулярно-генетические методы. Прежде всего, это метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и его модификации:

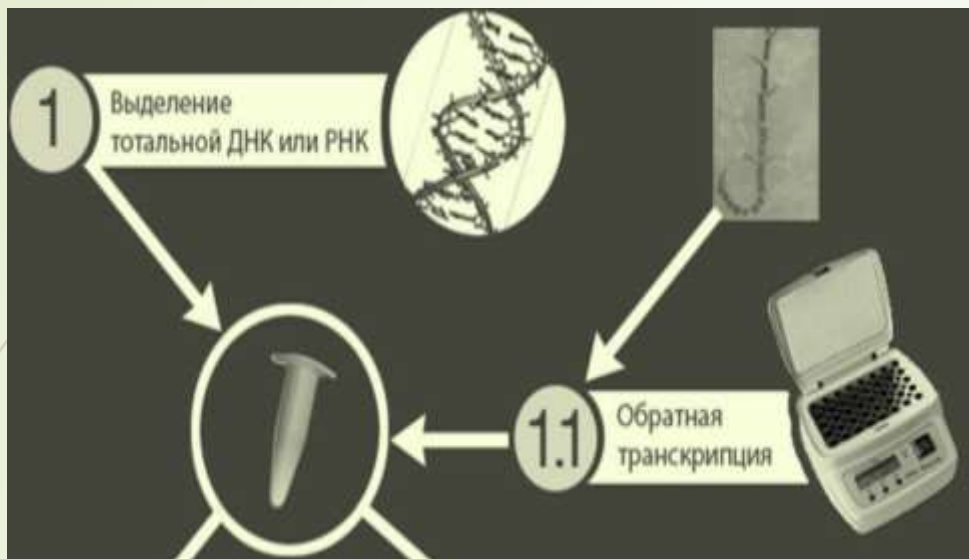
- ▶ **прямая, с обратной транскрипцией ОТ-ПЦР (RT-PCR),**
- ▶ **вложенная (NESTED PCR), изометрическая (LAMP PCR), FLASH ПЦР (FLASH-PCR), ПЦР в реальном времени (Realtime – RQ-PCR),**
- ▶ **матричный микрочиповый ПЦР (MICROCHIP PCR), мультипраймерная ПЦР (MULTIPLEX PCR, MULTIPRIMER PCR), цифровая ПЦР (DIGITAL PCR, dPCR)**
- ▶ **секвенирования следующего поколения (NGS).**

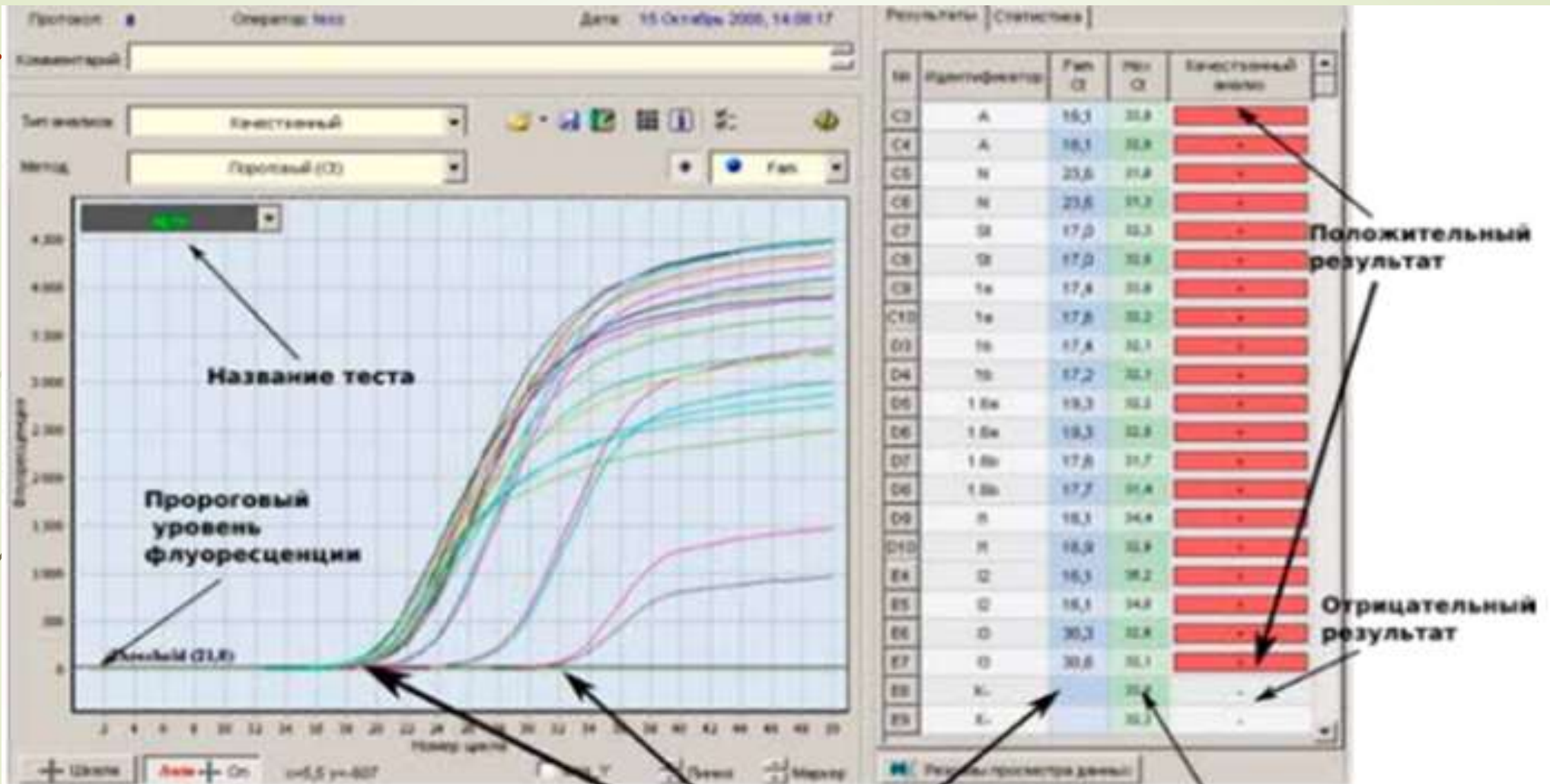
* Достоинствами этих тестов являются их специфичность и высокая чувствительность, позволяющие поставить точный диагноз при минимальных концентрациях возбудителей, когда применение других общепринятых методов не эффективно.

ПЦР с обратной транскрипцией, ОТ-ПЦР (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)

- ▶ У большинства растительных вирусов геном представлен одноцепочечной РНК, вирион также состоит из одноцепочечной ковалентнозамкнутой РНК, но из-за высокого процента парных оснований, обладает упорядоченной структурой.
- ▶ Однако ПЦР может быть использована и для диагностики РНК содержащих вирусов и вирионов, поскольку еще в 1970 г. был открыт фермент – обратная транскриптаза (она же ревертаза, или РНК-зависимая ДНК-полимераза), который синтезирует ДНК на матрице РНК. Эта кДНК затем используется в качестве матрицы для ПЦР







Положительный результат

Отрицательный результат

Номер цикла при пороговом уровне флуоресценции для канала FAM (специфика)

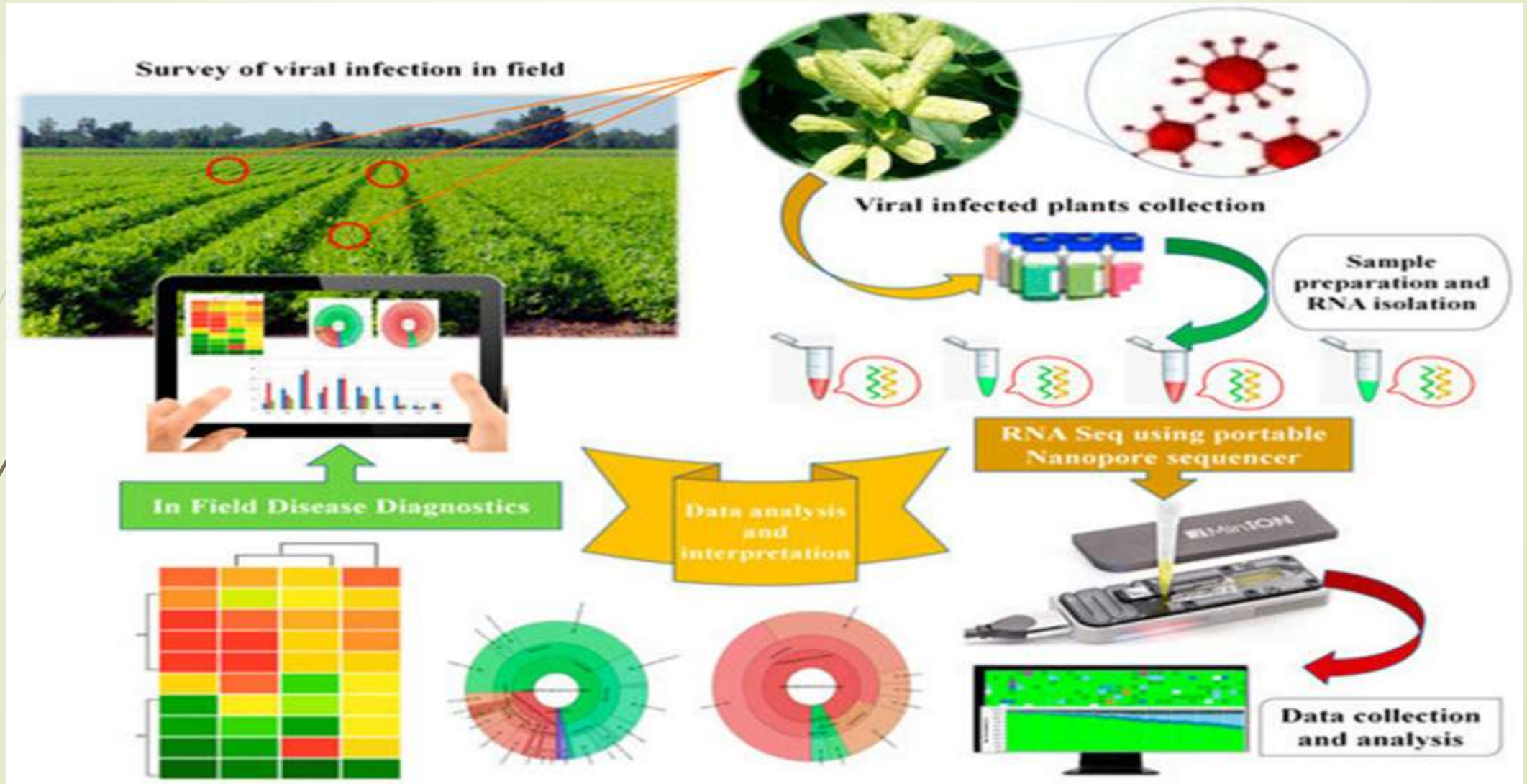
Номер цикла при пороговом уровне флуоресценции для канала HEX (ВК)

активация
чтобы активи

Идентификация вируса



Методы секвенирования следующего поколения (NGS)





Выводы и будущие тенденции

- **Основная задача сельского хозяйства в этом столетии состоит в том, чтобы производить питательные продукты питания для растущего населения мира на устойчивой основе, одновременно защищая окружающую среду и здоровье человека. Ущерб, причиняемый вредителями и болезнями, оказывает значительное негативное экономическое воздействие на сельское хозяйство, особенно важное значение при этом имеют эмерджентные вирусные заболевания.**



Спасибо за внимание!