

**Достижения ДНК-технологий  
В ДИАГНОСТИКЕ И  
ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ФИТОПАТОГЕНОВ**

***С.К. ЗАВРИЕВ***

**ИБХ РАН**

**Москва, 3 декабря 2008**

## Доступные методики для тестирования растительных патогенов

---

- ◆ ИФА
- ◆ ПЦР
- ◆ Гибридизация нуклеиновых кислот
- ◆ Биоиндикаторные тесты
- ◆ Электронная микроскопия
- ◆ Анализ клеточных включений (для некоторых вирусов)

# Преимущества ИФА

---



- ✦ **Удобство использования**
- ✦ **Стоимость**
- ✦ **Скорость**
- ✦ **Доступность**
- ✦ **Универсальный формат**

# Недостатки ИФА



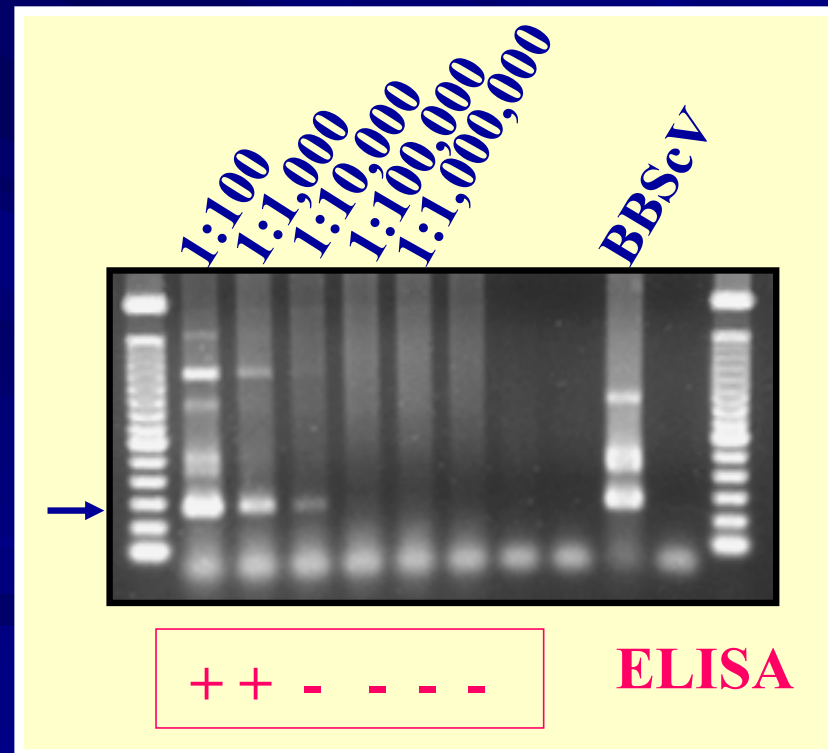
- 
- ◆ **Неспецифическая тканевая реакция**
  - ◆ **Возможность тестирования ограничена наличием антител к данному патогену**
  - ◆ **Зависимость свойств и качества антител от конкретной партии**
  - ◆ **Не всегда возможно независимое подтверждение**

# Преимущества использования тестов на основе ПЦР



- 
- ◆ Широкая распространенность
  - ◆ Высокая чувствительность
  - ◆ Высокая специфичность
  - ◆ Отсутствие проблем с неспецифической тканевой реакцией
  - ◆ Высокая скорость получения результата анализа
  - ◆ Результаты могут быть подтверждены

# Сравнение чувствительности методов ИФА и ПЦР-диагностики на примере карлавирусов

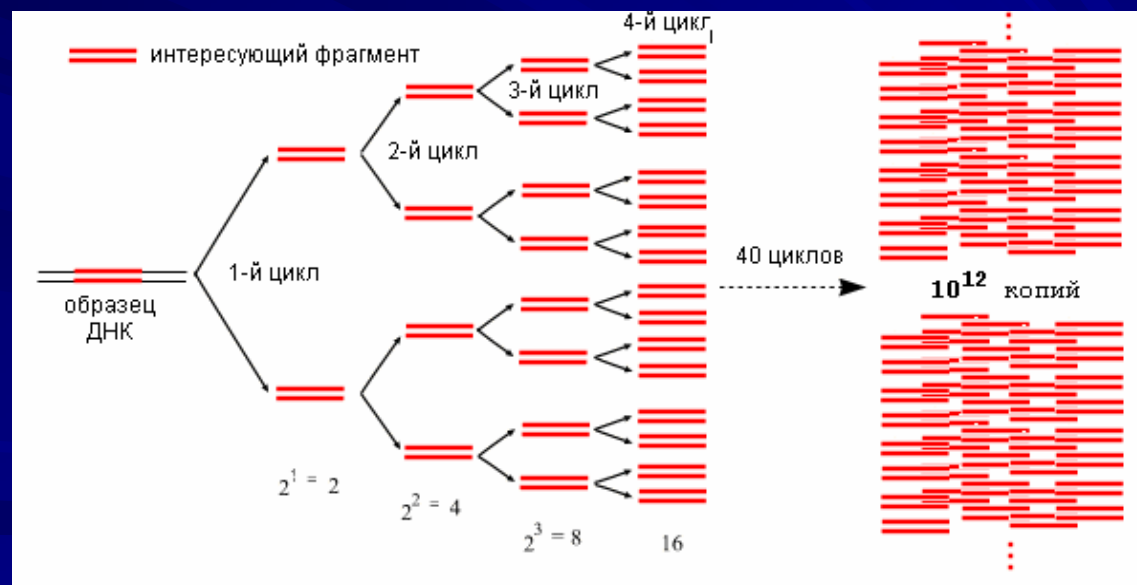


# Недостатки использования тестов на основе ПЦР



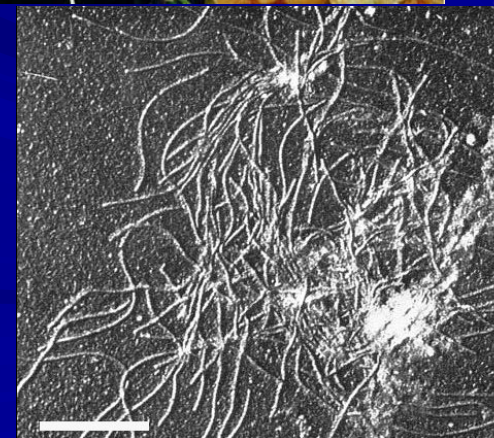
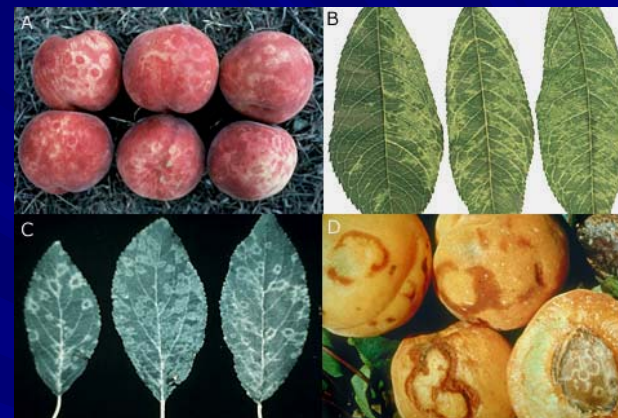
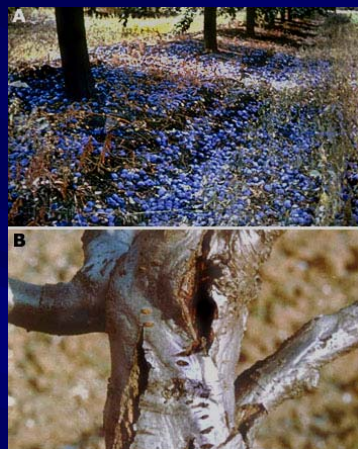
- ✦ **Высокие требования к квалификации персонала**
- ✦ **Возможное наличие ингибиторов ПЦР**
- ✦ **Проблемы с контаминацией**

# Экспоненциальная амплификация методом ПЦР



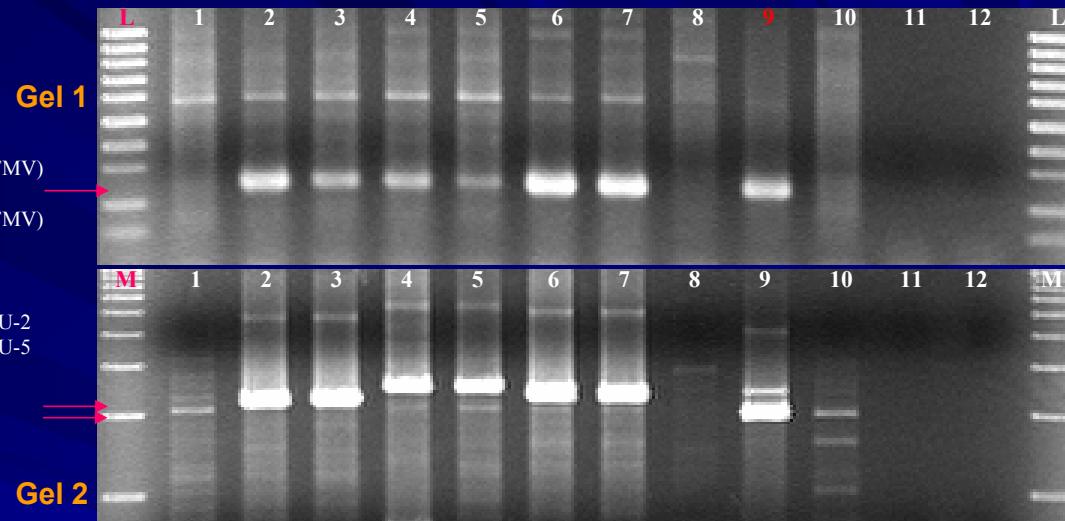


## Симптомы заболевания вызываемые вирусом шарки сливы на косточковых



## Оптимизация ПЦР-диагностики потивирусов

Lane	Sample
L	100bp Ladder
M	500bp Ladder
1.	Healthy Scarlet O'Hara
2.	Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) FMV-C Common Strain
3.	Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV) 95-2 Russet Crack Strain
4.	Sweet potato virus G (SPVG) LSU-1
5.	Sweet potato virus G (SPVG) LSU-3
6.	Ipomoea vein mosaic virus (IVMV) LSU-2
7.	Ipomoea vein mosaic virus (IVMV) LSU-5
8.	Negative Potato Tubers
9.	<b>PVV</b>
10.	<b>PVV-c</b>
11.	Water RT Control
12.	Water PCR Control



### Method:

- The samples in **Gel 1** were run by using the primer set Poty-F1/Poty-R1. The test was performed by using a PCR profile containing the following conditions: denature 94°C, 1 minute; annealing 45°C, 2 minutes; elongation 72°C, 4 minutes - 35 cycles.  
The samples in **Gel 2** were run by using the primer set Poty-F2/Poty-R2. The test was performed by using a PCR profile containing the following conditions: denature 94°C, 1 minute; annealing 50°C, 2 minutes; elongation 72°C, 4 minutes - 35 cycles.

### Results:

- In **Gel 1**, sample number 1 tested negative while the rest of the other samples tested positive for potyvirus(es) based on the Potyvirus Group RT-PCR Test.  
In **Gel 2**, sample number 1 tested weakly positive while the rest of the other samples tested positive for aphid-transmitted potyvirus(es) based on the aphid-transmitted Potyvirus RT-PCR Test.
- Sweet potato feathery mottle virus (SPFMV), Sweet potato virus G (SPVG), and Ipomoea vein mosaic virus (IVMV) can now be added to the list of pathogens that can be detected by using the Potyvirus Group primers.



Уничтожение деревьев,  
пораженных вирусом шарки сливы



**F**luorescent  
**A**mplification based  
**S**pecific  
**H**ybridization

**FLASH**

## Схема детекции результатов ПЦР в формате FLASH

Принцип флуоресцентной детекции

# Основные стадии детекции в формате FLASH-ПЦР

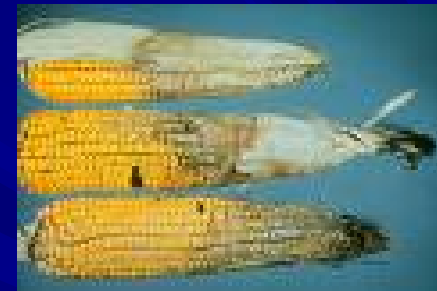
## 1. Выделение тотальной ДНК



## 2. Амплификация



## 3. Детекция и анализ результатов (занимает около 1 мин)



**Последствия, вызванные инфекцией вирусом tristeza citrusовых**

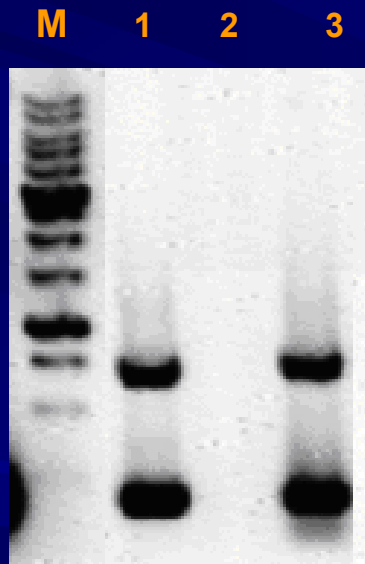


## Симптомы ожога плодовых (*Erwinia amylovora*)





**Обнаружения генома бактерии  
*Erwinia amylovora*,  
возбудителя ожога плодовых**



**844 п.н**



**1 – ДНК из культуры клеток, зараженных  
*Erwinia amylovora***

**2 – ДНК из здорового растения**

**3 – ДНК из больного растения**

**M – 1 kb ДНК маркер**

**187 п.н**

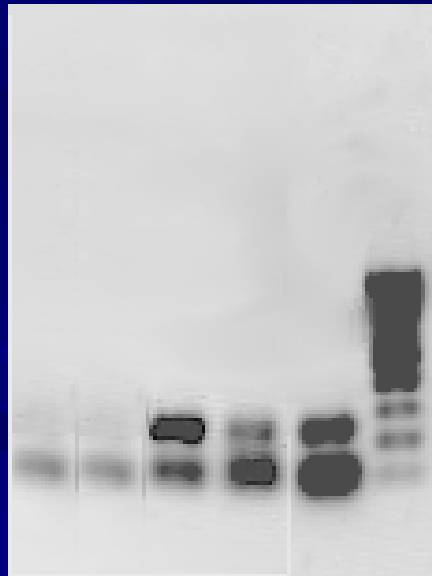


Симптомы бурой и  
кольцевой гнили  
картофеля (*Ralstonia  
solanacearum*)



## Обнаружения генома бактерии *Ralstonia solanacearum*, возбудителя бурой гнили картофеля

1 2 3 4 5 M



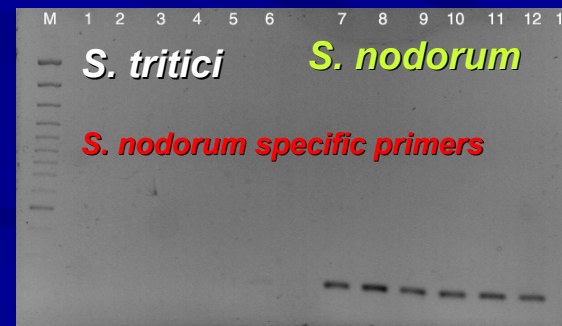
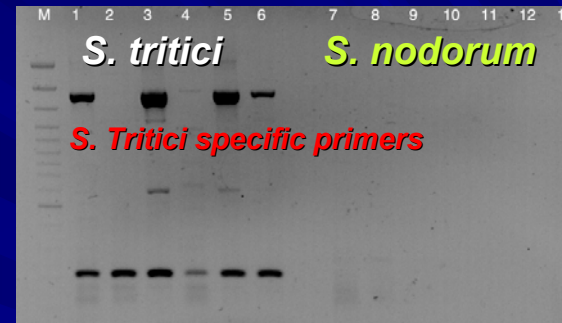
1. ДНК из стебля здорового картофеля
  2. ДНК из стебля здорового картофеля (разведение 1:10).
  3. ДНК из клубенька картофеля, инфицированного *Ralstonia solanacearum*.
  4. ДНК из клубенька картофеля, инфицированного *Ralstonia solanacearum* (разведение 1:10).
  5. ДНК из бурых, одревеневших стеблей картофеля, инфицированного *Ralstonia solanacearum*
- M – ДНК маркеры

← 300 п.н

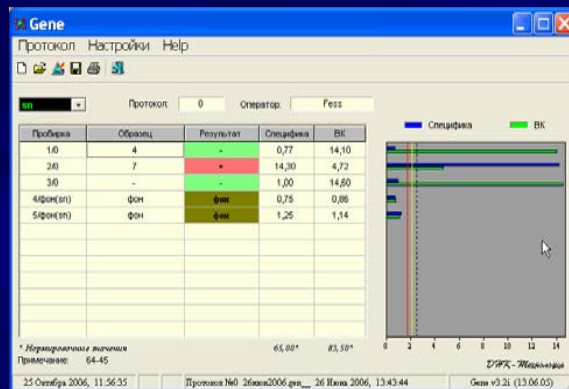
← 200 п.н

## *S. tritici* and *S.nodorum* detection with specific primers by gel electrophoresis

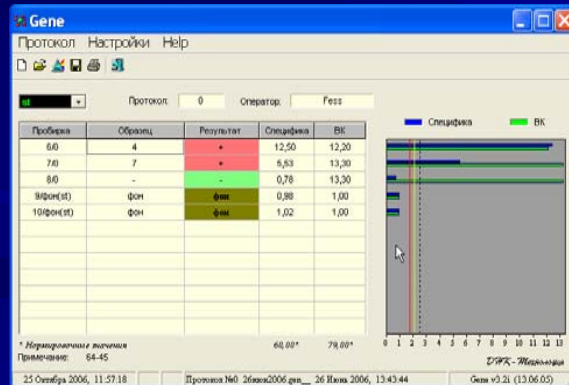
- *S. tritici* 5/212
- *S. tritici* B-7/293
- *S. tritici* B-35/ЧИ 4
- *S. tritici* B-885
- *S. tritici* 5-136
- *S. tritici* 5-97
- *S. nodorum* B-28/КГ3 8
- *S. nodorum* NBCP-6-29
- *S. nodorum* NBO-110
- *S. nodorum* B-8111
- *S. nodorum* NMO-112
- *S. nodorum* P-8



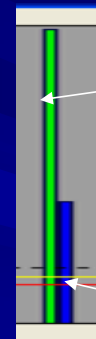
# FLASH based diagnostic of *Septoria tritici* and *Stangospora nodorum*



*Stangospora nodorum*



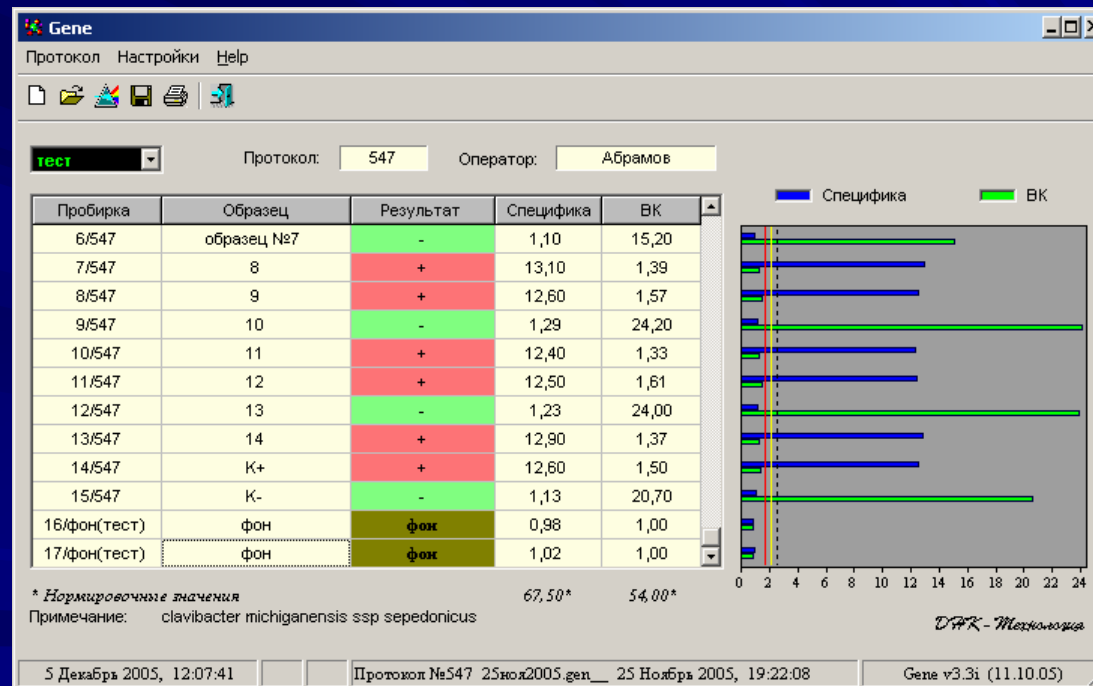
*Septoria tritici*



internal control (green)

specific fragment (blue)

## FLASH-PCR detection of *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*



Грибы рода *Fusarium* являются широко распространенными патогенами, поражающими огромное количество разнообразных растений и приносящие значительный ущерб сельскохозяйственному производству. Наиболее серьезным заболеванием, вызываемым этой группой грибов, является фузариоз зерновых культур. Вредоносность заболевания проявляется не только в прямых потерях - уменьшении урожая зерна, но и в ухудшении его качества – накоплении опасных микотоксинов, продуктов жизнедеятельности грибов. Актуальность изучения и определения токсигенных грибов и продуцируемых ими микотоксинов в медицине и агропромышленной индустрии признана во всем мире и связана с их

чрезвычайно серьезной опасностью для здоровья человека и с/х животных



- В Российской Федерации предельно допустимые концентрации на содержание фузариотоксинов введены в 1996 году и имеют максимальные значения (мг на кг зернового сырья): ДОН – 1, Т-2 токсин – 0.1, зеараленон – 1.0 и афлатоксин В<sub>1</sub> – 0.005

Главными факторами, определяющими загрязнение зерна микотоксинами, являются **степень заражения и видовой состав** развивающихся на нем грибов. - продуцирование токсинов имеет **выраженный видоспецифичный характер** .

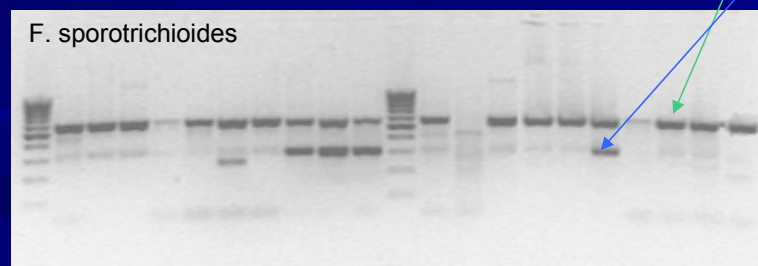
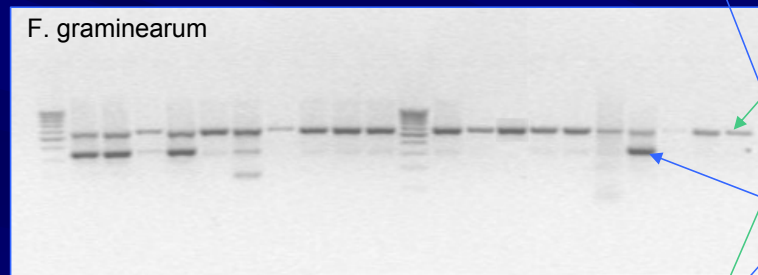
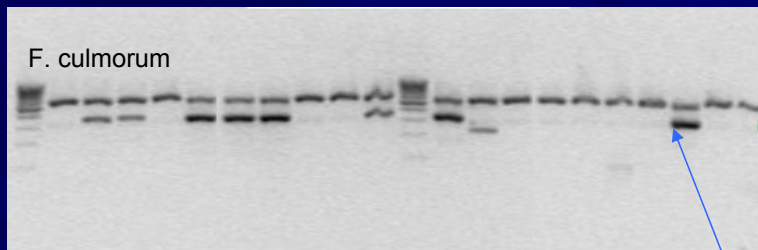
Поэтому, анализируя комплекс патогенов в партии зерна, можно **прогнозировать**, какие именно токсины могут присутствовать или накопиться в этом зерне при изменении условий хранения под воздействием **биотических или абиотических стрессов**.

Микологический анализ зерна, основанный на морфологических признаках и характере роста грибов, требует достаточно длительного периода времени, высокой квалификации и **практических навыков**.

Штаммы наиболее токсигенных грибов рода *Fusarium* относятся к трем секциям: *Discolor* (*F. graminearum*, *F. culmorum*), *Sporotrichiella* (*F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. tricinctum*) и *Roseum* (*F. avenaceum*). Виды одной секции сходны по морфологическим критериям и профилям продуцируемых токсинов и, следовательно, **часто ошибочно идентифицируемым микробиологическими методами**



## ПЦР-диагностика *Fusarium spp.*

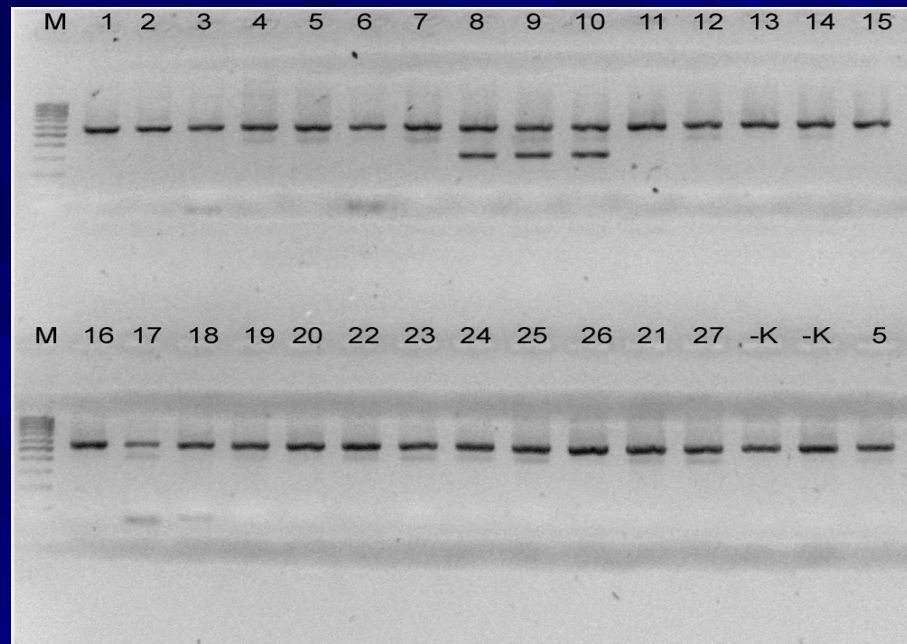


internal control

specific fragment

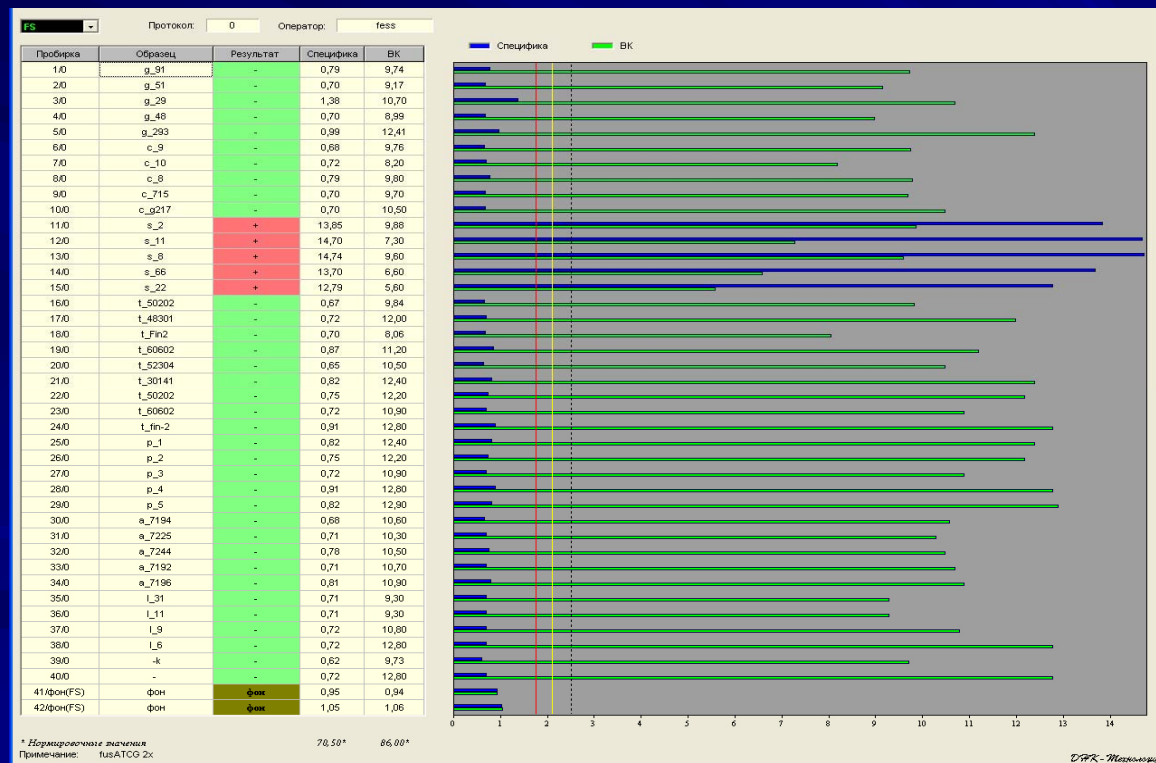
1. *F.graminearum* – g.91
2. *F.graminearum* – g.51
3. *F.graminearum* – g.29
4. *F.graminearum* – g.48
5. *F.culmorum* – c.9
6. *F.culmorum* – c.10
7. *F.culmorum* – c. 8
8. *F.sporotrichioides* – s.2
9. *F.sporotrichioides* – s.11
10. *F.sporotrichioides* – s.8
11. *F. sambucinum*
12. *F.avenaceum*
13. *F.roseum*
14. *F.equseti*
15. *F.solani*
16. *F.sporotrichioides*
17. *F.graminearum*
18. *F.culmorum*
19. *F.nivale*
20. water

Электрофореграмма результатов ПЦР ДНК различных видов грибов *Fusarium* с праймерами к *F. sporotrichioides*



1-4 *F. graminearum*, 5-7 *F. culmorum*, 8-10 *F. sporotrichioides*,  
11-15 *F. tricinctum*, 16-20 *F. poae*, 21-26 *F. avenaceum*

## ПЦР в формате FLASH различных видов *Fusarium* с праймерами к *F. sporotrichioides*





# БиоТерроризм

Биологический  
(человек)

АгроБиологический  
(растения, животные)



Экологический  
(природа, водоемы и др.)

Продовольственный  
(резкое уменьшение запасов)







**Средняя оценка мировых потерь урожаев и, как следствие, продовольствия, вызванная болезнями и насекомыми, в 1986 году оценивается в пределах 48% - и это без всякого **БИОтерроризма!!!****



## Готовые наборы:

- 1. *Ralstonia solanacearum*
- 2. *Erwinia amylovora*
- 3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
- 4. *Potato cyst nematoda Globodera rostochiensis*
- 5. *Potato cyst nematoda Globodera pallida*
- 6. Potato virus Y
- 7. Potato Virus X
- 8. Potato Mop Top virus
- 9. Potato leaf roll virus
- 10. Potato virus S
- 11. Potato virus M
- 12. Potato virus A
- 13. *Nematoda Bursaphelenchus mucronatus*
- 14. *Nematoda Bursaphelenchus xylophilus*
- 15. Potato spindle tuber viroid
- 16. *Plum pox virus*
- 17. Potato actin mRNA
- 18. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (maize wilt)
- 19. *Beet necrotic yellow vein virus* (Rhizomania)

## В процессе:

- 20. *Septoria tritici*
- 21. *Stagonospora nodorum*
- 22. *Fusarium graminearum*
- 23. *Fusarium culmorum*
- 24. *Fusarium sporotrichioides*
- 25. *Didymella* spp.
- 26. *Phytophthora infestans*
- 27. *Pectobacterium carotovorum*  
subsp. *Carotovorum*
- 28. *Phoma* sp.
- 29. *Clavibacter michiganensis*  
subsp. *Michiganensis*

# Мобильная ПЦР-лаборатория



 **ДФК - Механика**  
научно-производственная фирма



