ТАТАРСКИЙНАУЧНОИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙИНСТИТУТ

СЕЛЬСКОГОХОЗЯЙСТВА

Направахрукописи





ВологинСеменГерманович

ДИАГНОСТИКАВИРУСЛКАРТОФЕЛЯИШТАММОВЫИСОСТАВПАТОГЕНАВСРЕДНЕМПОВОЛЖЬЕ

защитарастений

Диссертациянасоисканиеученойстепеникандидатабиологическихнаук

НаучныйруководительдсхнЗамалиеваФФ

Казань





СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 

ГЛАВАОБЗОРЛИТЕРАТУРЫ 

 Вирусныеболезникартофеля 

 Характеристикавирусовкартофеля 

 Хвирускартофеля 

 Мвирускартофеля 

 Вирусскручиваниялистьевкартофеля 

 вирускартофеля 

 Диагностикавирусныхпатогенов 

 Визуальноевыявлениевирусов 

 Методбиологическоготестирования 

 Электроннаямикроскопия 

 Иммунобиологическиеметодыдиагностики 

 Молекулярногенетическиеметодыисследования 

ГЛАВАПМАТЕРИАЛЫИМЕТОДЫИССЛЕДОВАНИЯ 

 Объектисследования 

 Учетныеточкиисследований 

 Способыразрушениярастительногоматериала 

 Преаналитическаяподготовкарастительногоматериала 

 Условиявыращиваниярастенийвзащищенномгрунте 

 Идентификацияштаммовойпринадлежности 

 Искусственноезаражениерастенийкартофеляитабака 

 МетодикапроведенияИФА 

 Переченьреактивовиспользовавшихся

припроведенииИФА 

МетодикапроведенияОТПЦР 



І



з

 КонструированиеолигонуклеотидныхпраймеровиопределениенуклеотиднойпоследовательностиДНК 

 Математическаяобработкарезультатов 

ГЛАВАРЕЗУЛЬТАТЫИИХОБСУЖДЕНИЕ 

 Преаналитическаяподготовкарастительногоматериаладля

проведениядиагностическихисследований 

 Анализструктурылистовыхиклубневыхпроб

картофеля 

 Влияниесоставабиоматериалаиусловийтемпературногохранения 

 Влияниебуферныхсоединений 

 Действиеантисептическихсоединений 

 Алгоритмпреаналитическойподготовки

биоматериала 

 Мониторингвирусныхпатогеноввусловиях

открытогогрунта 

 Диагностикавирусоввмеристемныхлинияхкартофеля 

 БиометрическийанализданныхИФА 

 Анализнеинфицированныхобразцов 

 Расчетвеличиныпороговогозначения 

 АнализУЭДГинфицированныхобразцов 

 СтруктурапопуляциивСреднемПоволжье 

 Оценкачастотыраспространениясеротиповвируса 

 Идентификацияизолятов 

 Идентификациявозбудителякольцевогонекроза

клубнейкартофеля 

 Поисксайтоврекомбинациивгеномеизолятов 





АнализнуклеотидноипоследовательностиСРгенаи

белкаоболочки 

ВЫВОДЫ 

ПРАКТИЧЕСКИЕРЕКОМЕНДАЦИИ 

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ 

СПИСОКСОКРАЩЕНИЙ 

ПРИЛОЖЕНИЕ 





ВВЕДЕНИЕ

АктуальностьпроблемыРастениякартофелявсилусвоихбиологическихособенностейподверженыинфицированиюразличнымивирусамиВестественныхусловияхвозделываниякартофельпоражаетсявидамивирусныхпатогеновкартофеляотноситсякродусемействаПатогенширокораспространенвовсеммиреиотноситсякчислунаиболеевредоносныхагентовпоражающихкартофельатакжедругихкультурныхпредставителейсемействапасленовыхтоматперецитабакСогласнооценкаминфицированиеприводиткснижениюурожайностикартофелянаОсновнойпутьпередачисвязансосложнымпищевымповедениемнасекомыхкрылатыхтлейосуществляющихнеперсистентныйпереноспатогенаВинфицированныхрастенияхкартофелявируспроникаетвклубниспомощьюкоторыхвусловияхаграрногопроизводстваможетраспространятьсянаобширныетерриторииКпричинамширокогораспространениявнастоящеевремяотносятнарушениеагротехническихприемоввозделываниякартофеляиспользованиезараженногосеменногоматериалаатакженесовершенствометодовобнаруженияпатогенаИванюкидр

ОбластьдиагностикииидентификациивирусовявляетсяважнымэлементомвсферезащитырастенийотболезнейСовременныесистемыведениясеменоводствакартофелянаоздоровленнойбезвируснойосновепредусматриваютприменениедиагностическогоконтролявирусногопоражениянаразличныхэтапахсеменоводческогопроцессасцельюсвоевременногоудаленияинфицированныхпартийпосадочногоматериалаизагропромышленногопроизводстваЗамалиеваТакжеметодылабораторнойдиагностикиприменяютсявходеселекционногопроцессаприсозданиисортовкартофеляустойчивыхкСалиховаидр





ВпоследниегодывРоссииразработанытестсистемыдляобнаружениявирусовкартофеляоснованныенаметодахиммуноферментногоанализаБобковаидрКомаровидриммунохроматографическогоанализаВызоваидрполимеразнойцепнойреакцииРязанцевЗавриеватакжегибридизациинуклеиновыхкислотДанныеработывосновномпосвященыаналитическомуэтапуисследованийразработкеновыхилиусовершенствованиюсуществующихпротоколовпроведениясложныхбиохимическихреакцийлежащихвосноведиагностикиПриэтомостаютсянедостаточноисследованнымиаспектысвязанныеспреаналитическимсостояниемисследуемогобиологическогоматериалаусловиямиегообработкиихраненияатакжеособенностяминакоплениявирусныхпатогеноввразличныхрастительныхтканяхНесомненночтовсеперечисленныефакторыоказываютзначительноевлияниенарезультатылабораторнойдиагностикиКрометоговнастоящеевремяпрактическинеуделяетсявниманиевопросамсвязаннымспостаналитическимэтапомдиагностическихисследованийфитопатогеновПубликациинаэтутемунемногочисленныКозловидрОбручковВасильевВтожевремястатистическаяобработкаданныхвноситбольшойвкладвпроцессинтерпретациирезультатовлабораторнойдиагностикиСвежоваидр

ВнастоящеевремябольшуюзначимостьприобретаетфитосанитарныймониторингпредусматривающийоценкувидовогоиштаммовогосостававирусоврастенийИзвестночтообладаетсложнойпопуляционнойструктуройОписанонесколькоштаммоввирусаиндуцирующихобразованиеразличныхсимптомовнарастенияхкартофеляатакжеразличающихсяпосерологическимимолекулярно





генетическимсвойствамНаибольшуюугрозудляагропромышленногопроизводствапредставляютштаммыиндуцирующиенекротическоепоражениеклубнейкартофеляприводящиекзначительномуснижениюихтоварноговидаипищевойценностиВайдеманнидрИванюкидрТакжесерьезнуюопасностьнесутрекомбинантныеформыхарактеризующиесявысокойэффективностьюпереносаспомощьюнасекомыхВрезультатебыстрогораспространениярекомбинантныхштаммовспособныхкиндукциинекрозообразованиямногиесортакартофеляпотерялисвоюпривлекательностьдлясельскохозяйственногопроизводства

ВСредневолжскомрегионеРоссиисосредоточенызначительныеплощадипосадоксеменногоитоварногокартофеляКрометогоздесьфункционируетрядкрупныхселекционныхисеменоводческихучрежденийВсвязисэтимисследованиеаспектовсвязанныхслабораторнойдиагностикойифитосанитарныммониторингомпопуляционногосоставанатерриторииданногорегионаявляетсяактуальным

ЦельизадачиисследованияЦельюработыявилосьустановлениеособенностейдиагностическоговыявленияиштаммовогосоставапатогенавСреднемПоволжье

Длядостиженияцелибылипоставленыследующиезадачи

 Усовершенствоватьпроцессподготовкирастительногоматериаладлядиагностическогообнаружения

 Изучитьуровеньраспространенияидругихвирусныхпатогеновврастенияхкартофеляоткрытогогрунтаатакжевмеристемныхлиниях

 ОсуществитьбиометрическийанализданныхИФАполученныхпридиагностике

 ИсследоватьштаммовыйсоставвирусанатерриторииСреднегоПоволжья





НаучнаяновизнаВпервыеустановленэффектповышениядостоверностирезультатовлабораторнойдиагностикиприиспользованиикомплексапреаналитическихфактороводнократногоциклазамораживанияоттаиванияразрушеннойлистовойтканирастенийатакжевнесениявсоставлистовыхиклубневыхпробкартофелямертиолятанатрияитиосалициловойкислотыСпомощьюбиометрическогоанализавыявленосуществованиевзаимосвязимеждурезультатамиИФАипроцессомраспространенияпатогенаввегетативныхпоколенияхкартофеляВпервыенатерриторииСреднегоПоволжьяобнаруженациркуляцияштаммов™ииндуцирующихразвитиесимптомовкольцевогонекрозаклубнейкартофеляНатерриторииевропейскойчастиРоссиипоказанораспространениеизолятовобладающихрекомбинантнойформойгенома

ПрактическаязначимостьработыПолученныерезультатымогутбытьпримененывиспытательныхлабораторияхсистемыРоссельхознадзораиРоссельхозцентраатакжевучрежденияхсвязанныхссеменоводствомиселекциейкартофеляРазработанныйалгоритмпреаналитическойподготовкиисследуемогоматериалаиспользуетсявГНУТатНИИСХпридиагностическомвыявлениивирусоввсистемесеменоводствакартофелянаоздоровленнойоснове

Охарактеризованныеизолятымогутбытьиспользованывселекционныхисследованияхприсозданииформрастенийустойчивыхкпатогенуатакжемогутбытьпримененыприсозданиидиагностикумовиконтрольнойпанелиобразцовпредназначеннойдляоценкикачестваработыдиагностическихтестсистем

СвязьработыснаучнымипрограммамиисобственныйвкладавтораРаботапроводиласьвсоответствиестемамииПрограммыфундаментальныхиприоритетныхприкладныхисследованийпонаучномуобеспечениюагропромышленногокомплексаРоссийской





ФедерациинапериодиггНаучныеположениядиссертацииивыводыбазируютсянарезультатахсобственныхисследованийавторапроводившихсянапротяженииггПоложениявыносимыеназащиту

 АлгоритмпробоподготовкирастительногоматериалаповышающийэффективностьдиагностическихисследованийметодомИФА

 ЗависимостьданныхИФАотпродолжительностираспространенияврядувегетативныхпоколенийкартофеля

 СтруктурапатогенанатерриторииСреднегоПоволжьяпредставленнаяизолятамипроявляющимисвойстваштаммов°иобладающимирекомбинантнойформойгенома

АпробацияработыОсновныеположениядиссертациипредставленынаМеждународнойшколеконференциимолодыхученыхБиологиянаукавекаПущиноМеждународнойконференцииБиологияклетокрастенийЗеленограднаучнопрактическойконференцииКартофелеводстворезультатыинновациипрактическийопытМоскваВсероссийскойнаучнопрактическойконференцииАктуальныепроблемысельскохозяйственнойнаукиипрактикивсовременныхусловияхипутиихрешенияКазаньВсероссийскойнаучнопрактическойконференциимолодыхученыхИнновационныеразработкимолодыхученыхАПКРоссииКазаньМеждународнойнаучнопрактическойконференцииСостояниеиперспективынаучныхисследованийпокартофелеводствуовощеводствуибахчеводствуАлматымеждународногосимпозиумаКлеточнаясигнализацияурастенийКазаньМеждународнойнаучнопрактическойконференциимолодыхученыхиспециалистовВкладмолодыхученыхвинновационноеразвитиеАПКРоссииЕкатеринбургВсероссийскойнаучнопрактическойконференциимолодыхученыхиспециалистовПроблемыиперспективыаграрнойнаукивРоссииСаратовВсероссийскойнаучно





практическойконференцииНаучноеобеспечениеагропромышленногокомплексаРоссииКазаньВсероссийскойконференциимолодыхученыхСтратегиявзаимодействиямикроорганизмовирастенийсокружающейсредойСаратовмеждународногосимпозиумаМолекулярныеаспектыредоксметаболизмарастенийКазаньнаучнойконференцииМолекулярногенетическиеподходывтаксономиииэкологииРостовнаДонуВсероссийскойнаучнойконференциисмеждународнымучастиемБиотехнологиинаукаипрактикаинновацииибизнесАстрахань

ПубликацииПотемедиссертационногоисследованияопубликованонаучныхработизнихстатьивведущихрецензируемыхизданиях

ВЫВОДЫ

 ПрименениеусовершенствованногоалгоритмапреаналитическойподготовкивключающегоавнесениевсоставразрушенногорастительногоматериалаМтиосалициловойкислотыиМбуферабоднократногоциклазамораживанияоттаивания вудаленияразрушенныхрастительныхкомпонентовспомощьюцентрифугированияпозволилоповыситьуровеньвыявлениявлистовыхпробахнавклубневыхэтиолированныхросткахнавбиоматериалемеристемныхрастенийна

 ВусловияхоткрытогогрунтасевернойчастиСреднегоПоволжьянаибольшейчастотойраспространенияхарактеризовалсяобнаруженныйвисследованныхобразцовДругиепатогеныдиагностировалисьрежеМВКХВКиВСЯКизученныхобразцов

 МеристемныерастениясортовигибридовкартофеляхарактеризовалисьразличнымколичественнымивидовымсоставомвирусныхпатогеновПоражениемеристемныхлиниисортовкартофелясоставилоМВКХВКиВСЛКЛинииперспективныхгибридовсодержалиМВКваУВКвисследованныхслучаев

 РезультатыИФАотражающиеуровеньсодержаниявбиоматериалехарактеризуютсяпроявлениямиасимметриииэксцессаВыявленпереходотодновершиннойкдвухвершиннойформевариационногорядаизучаемогопризнакапроисходящийприраспространенииврядувегетативныхрепродукцийкартофеля



из

НатерриторииСреднегоПоволжьяпатогенпредставленизолятами

проявляющимисвойстваштаммов атакжештаммови

индуцирующихразвитиекольцевогонекрозаклубнейкартофеляУизолятовобнаруженысайтырекомбинационныхпереходоввгенахНСРгоиНуклеотиднаяпоследовательностьСРгенаиаминокислотнаяпоследовательностьбелкаоболочкисоответствуюттипичнымштаммампатогена