

Проблемы лабораторной диагностики патогенов картофеля

Владимир Карандашов, к.б.н.

Руководитель испытательной лаборатории
ООО «Риналаб»

КАРТОФЕЛЬ И ОВОЩИ АГРОТЕХ 2024

24 января 2024 г., г. Москва

ИФА или ПЦР для диагностики вирусов картофеля

Критерий	ПЦР	ИФА
Стоимость	ПЦР примерно в 4 раза дороже (?)	
Анализ 100/200 клубней без объединения	нет	да
Объединение в одну пробу	4/8-10*	до 4-х
Анализ покоящихся клубней	да**	нет, требуется проращивание
Сроки проведения. Покоящиеся клубни	1-2 дня	>1 месяца. Период покоя
Сроки проведения. Период вегетации	1-2 дня	1-2 дня
Мультиплексный анализ (одновременное определение нескольких вирусов)	да, определяется количеством каналов амплификатора	нет
Чувствительность	высокая	достаточная

*при высоком уровне поражения вирусами не всегда получается определить точный процент поражения при анализе объединённых проб. Нужно либо снижать объём образца, либо проводить ИФА отдельных клубней

**при невысоком количестве вирусов в покоящихся клубнях, например, когда заражение произошло в самом конце вегетации, могут быть проблемы с интерпретацией полученных результатов из-за низкого уровня сигнала

У каждого метода есть свои преимущества и свои недостатки. Выбор метода индивидуален. Критерии выбора - % поражения, требуемая точность определения % поражения, сроки. Высокий % поражения, важность точного определения % поражения, есть время – ИФА

Лабораторный анализ СКРЫТОГО заражения пектолитическими бактериями (возбудители чёрной ножки и мокрой гнили клубней *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.)



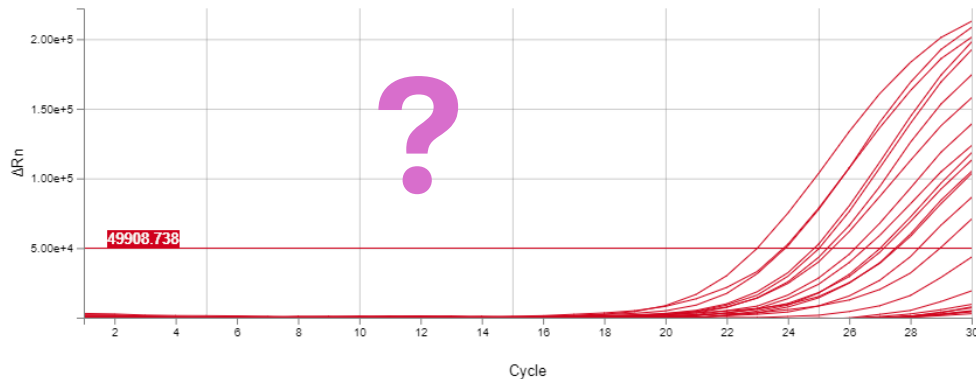
- бактерии присутствуют практически во всех образцах. Вопрос не в факте их наличия, а в их количестве
- не существует общепринятого метода определения скрытого поражения картофеля пектолитическими бактериями
- объективные данные о поражении пектолитическими бактериями даёт комбинация микробиологии и ПЦР
- микробиологическая оценка количества жизнеспособных и вирулентных пектолитических бактерий
- ПЦР для подтверждения микробиологических данных и определения видового разнообразия



В ГОСТ Р 59551-2021 «Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов» диагностика бактериальных патогенов картофеля методом ИФА не предусмотрена

Проблема поздних циклов при проведении ПЦР

Amplification Plot

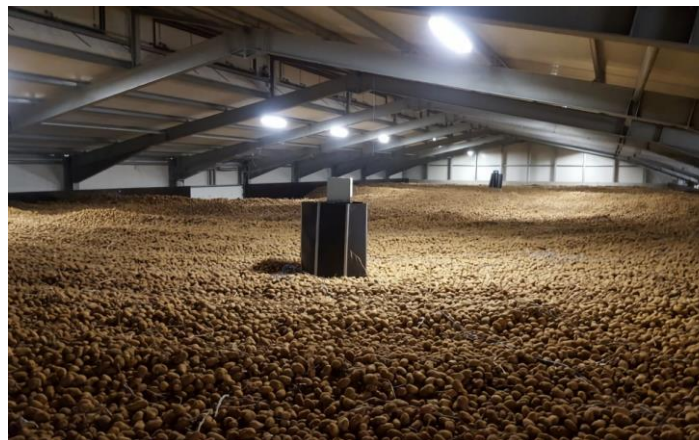


- нет критериев для однозначного ответа - это низкий уровень патогена или повышенный фон
- фон можно снизить оптимизируя условия проведения ПЦР
- при проведении вирусной диагностики, при среднем поражении и небольшом количестве таких результатов, их можно отмечать как +/- . SeedCalc8 принимает дробные значения для проведения анализа. Альтернативно можно провести ИФА
- при проведении диагностики пектолитических бактерий наличие подобных результатов не критично, поскольку, в любом случае, они свидетельствуют об очень низком уровне бактериального заражения
- при проведении анализа на заражение кольцевой гнилью или стеблевой нематодой необходимо провести тщательное обследование клубней, на основании которого делать финальное заключение*

Отбор репрезентативного образца для проведения лабораторного анализа

Для получения объективных результатов образец должен быть максимально репрезентативным

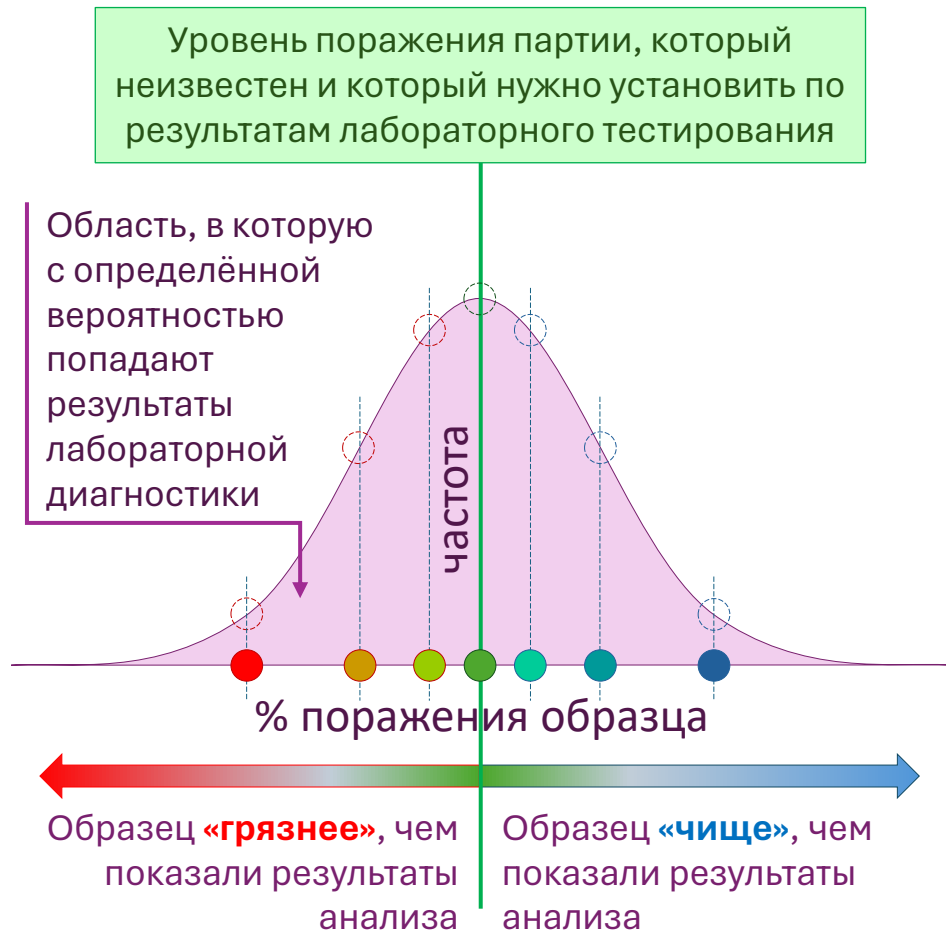
Результаты анализов относятся **исключительно к образцу**, а не к партии в целом!



Образец	PVY %	Участок поля
Образец № 1	11	Образец с края поля
Образец № 2	7	Образец из промежуточной части поля
Образец № 3	3	Образец из центральной части поля

**Можно ли в принципе отобрать репрезентативный образец?
В любом случае, к этому нужно стремиться**

Теория вероятностей и математическая статистика при отборе образцов и проведении лабораторной диагностики



- даже в самый репрезентативный образец материал попадает случайным образом (теория вероятностей)
- чем больше объём выборки и чем чаще проводятся измерения, тем выше достоверность результатов (ЗБЧ)
- для определения достоверного уровня поражения необходимо анализировать несколько образцов
- анализируя единственный образец, всегда есть вероятность, что в дальнейшем вы будете оперировать значениями, существенно отличающимися от реальных
- анализ хотя бы двух образцов, отобранных от одной партии, с большей вероятностью даст более объективные результаты
- при покупке/продаже семян, при заключении договорных обязательств и т.п. следует учитывать некоторые отклонения от значений, полученных при проведении лабораторных исследований

Заключительные положения

- Снижение ассортимента и качества и повышение стоимости и сроков поставки оборудования, реактивов, расходных материалов, необходимых для полноценного функционирования современной лаборатории и проведения диагностики
- Декларируемый производителями расходных материалов и реактивов контроль качества не работает (планшеты с дырками, «вода», ингибирующая реакции, нестабильное качество от партии к партии и т.д.)
- Современные молекулярно-биологические методы являются ключевыми при проведении лабораторной диагностики.

Отсутствие базовых знаний, профильного образования и опыта работы в области молекулярно-биологических исследований как у персонала диагностических лабораторий так и у признанных специалистов в области семеноводства часто ведёт к непониманию принципов лабораторной диагностики патогенов картофеля, неспособности адекватного выбора методов и интерпретации полученных результатов.