

## *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.

### Буряя гниль картофеля

#### Распространение:

**Европа:** Австрия, Армения, Бельгия, Великобритания (Англия – при перехвате), Венгрия, Германия, Греция, Грузия, Молдова, Нидерланды, Польша (только при перехвате), Португалия, Румыния, Сербия, Словакия, Словения, Турция, Украина, Чехия, Швеция.

**Азия:** Бангладеш, Бутан, Бруней-Даруссалам, Вьетнам, Индия, Индонезия, Иран, Китай (провинции на побережье Тихого океана), КНДР, Ливан, Малайзия, Мьянма, Непал, Пакистан, Республика Корея, Саудовская Аравия, Сингапур, Сирия (по неуточненным данным), Таиланд, Тайвань, Филиппины, Шри-Ланка, Япония.

**Африка:** Ангола, Бенин, Буркина-Фасо, Бурунди, Гамбия, Египет, Замбия, Зимбабве, Камерун, Кения, Конго, Ливия, Мавритания, Мадагаскар, Малави, Мали, Марокко, Нигерия, Реюньон, Руанда, Сенегал, Сьерра-Леоне, Сомали, Танзания, Уганда, Эфиопия, ЮАР.

**Северная Америка:** Мексика, США (штаты Висконсин, Иллинойс, Индиана, Мичиган, Нью-Гэмпшир, Нью-Джерси, Нью-Йорк, Пенсильвания, Северная Дакота).

**Центральная Америка:** Белиз, Гваделупа, Гватемала, Гондурас, Гренада, Доминиканская Республика, Коста-Рика, Куба, Мартиника, Никарагуа, Панама, Эль Сальвадор.

**Южная Америка:** Боливия, Бразилия (штаты Гояс, Парана, Пернамбуко, Риу-Гранди-ду-Сул, Сан-Паулу, Санта-Катарина), Венесуэла, Колумбия, Парагвай, Суринам, Перу, Тринидад и Тобаго, Уругвай, Французская Гвиана, Чили, Эквадор.

#### Поражаемые растения:

Большинство экономически значимых растений, поражаемых данным бактериозом, относится к семейству пасленовых. В странах ЕОКЗР основными хозяевами являются

картофель и томаты. Кроме того, вредный организм может заражать свыше 200 видов растений, преимущественно тропических и субтропических культур.

У *R. solanacearum* описано 5 рас:

Раса 1 поражает табак (*Nicotiana tabacum*), томаты (*Lycopersicon lycopersicum*), картофель (*Solanum tuberosum*), многие сорняки из рода пасленовых (*Solanum dulcamara* и др.) и некоторые диплоидные бананы (р. *Musa*), а также *Anthurium*, *Arachis hypogaea*, *Capsicum annuum*, *Gossypium hirsutum*, *Hevea brasiliensis*, *Hydrocotyle bonariensis*, *Hydrocotyle ranunculoides*, *Manihot esculenta*, *Persicaria pensylvanica*, *Ricinus communis*, *Zingiber officinale*.

Раса 2 поражает различные виды бананов (*Musa*, *Musa x paradisiaca*).

Раса 3 биовар 2 поражает ограниченный круг растений-хозяев, который включает картофель (*Solanum tuberosum*), томаты (*Lycopersicon lycopersicum*), баклажаны (*Solanum melongena*), декоративные растения рода пеларгонии (*Pelargonium*), табак (*Nicotiana*), а также сорняки, относящиеся к семейству пасленовых, в частности паслен сладко-горький (*Solanum dulcamara*), крапиву двудомную (*Urtica dioica*), значимость которой для переноса *Ralstonia solanacearum* на другие растения-хозяева пока недостаточно изучена.

Раса 4 поражает имбирь (*Zingiber officinale*).

Раса 5 поражает шелковицу (*Morus* sp).

#### Симптомы поражений:

При поражении вегетирующих растений картофеля возбудителем бурой бактериальной гнили растения внезапно увядают. Сосуды стеблей окрашиваются в бурый цвет и при поперечном разрезе из них вытекают капли бактериального экссудата. На клубнях происходит побурение

сосудистого кольца, при поперечном разрезе клубня, пораженного бактериозом, из сосудистых пучков на срезе выделяются капли кремового бактериального экссудата. Из глазков и



Увядаящая плеть растения картофеля, пораженная *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2

(фото: Дж. Элфинстоун, Центральная научная лаборатория, DEFRA, UK)

На томатах и баклажанах наблюдается увядание молодых листьев. Если условия благоприятны для патогена, увядание всего растения может произойти очень быстро. При менее благоприятных условиях болезнь



Продольный разрез стебля томата с побурением сосудистой системы

места прикрепления клубня к столону также выделяется экссудат, в результате чего на клубни налипают комочки почвы.



Клубень картофеля с бурым кольцом и выступившим экссудатом

развивается не так быстро, и стебель образует большое количество придаточных корней. Сосудистые пучки стебля становятся бурыми, при разрезе видны капли бактериального экссудата (ОЕPP/EPPO, 1992).



Растение томата с симптомами бактериального увядания



Растения томатов во Флориде, пораженные возбудителем *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2 (фото: Т. Момол и С.М. Олсон, Университет штата Флорида)

На растениях пеларгонии начальные симптомы проявляются в виде неправильных хлоротичных пятен и увядания нижних листьев. На листьях также могут появляться неправильные восходящие скручивания по краям. Увядшие листья становятся хлоротичными, затем на листьях образуются коричневые некрозы и растение засыхает и погибает. На более поздней стадии развития болезни у растения может ломаться стебель. У

стеблей и корней происходит бурое окрашивание сосудов, они чернеют и затем засыхают.

При высоких температурах (29-35 °С) и влажности бактерии после заражения растения быстро размножаются и болезнь может прогрессировать. При более низких температурах (22-25 °С) растения могут длительное время сохранять латентную инфекцию.



Растения герани с симптомами бурой гнили (фото: Отдел сельского хозяйства, торговли и защиты потребителя, Висконсин)

### Пути распространения:

Интродукция *R. solanacearum* в новые регионы может произойти с семенным и продовольственным картофелем, зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии.

Зараженность картофельных клубней может быть скрытой, что вызывается неблагоприятными погодными условиями, а также отчасти устойчивостью сорта и низкой вирулентностью патогена. Клубни со скрытым заражением являются наиболее вероятной причиной заноса возбудителя заболевания.

Естественное распространение медленное и происходит на ограниченные расстояния. Основными источниками болезни являются инфицированная почва, растительные остатки, клубни, несущие латентную инфекцию, сорняки, преимущественно из семейства пасленовых, ризосфера культурных и диких растений, поливные воды, может распространяться нематодой.

### Методы выявления и идентификации:

#### 1. Методы на основе ПЦР:

Для обнаружения заболевания в течение вегетационного периода проводят обследования. Однако симптомы болезни при визуальном осмотре можно спутать с симптомами других болезней. Симптомы на клубнях можно спутать с симптомами кольцевой гнили, вызываемой *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Кроме того, возможно скрытое заражение клубней и перекрестные реакции с близкородственными микроорганизмами. Поэтому для выявления и подтверждения бактериальной инфекции *Ralstonia solanacearum* необходимо следовать схеме анализа, описанного в Стандарте организации СТО ВНИИКР 4.009-2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации», подготовленном на основе диагностического протокола ЕОКЗР РМ 7/21.

### 1. Молекулярные методы:

#### 1.1. Классическая ПЦР (по Seal et al., 1993)

OLI-1 5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3';

Y-2 5'-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'.

#### 1.2. Классическая ПЦР (по Pastrik, Maiss, 2000)

Ps-1 5'-AGT CGA ACG GCA GCG GGG G-3';

Ps-2 5'-GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA-3'.

#### 1.3. Протокол мультиплексной ПЦР с внутренним контролем по Pastrik et al. (2002)

RS-1-F 5'-ACT AAC GAA GCA GAG ATG CAT TA-3';

RS-1-R 5'-CCC AGT CAC GGC AGA GAC T-3';

RS-3-R 5'-TTC ACG GCA AGA TCG CTC-3';

NS-5-F 5'-AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3';

NS-6-R 5' GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'.

Праймеры RS-1-F/RS-1-R специфичны для биоваров 1 и 2. Размер продукта 718 п.н.

Праймеры RS-1-F/RS-3-R специфичны для биоваров 3, 4 и 5. Размер продукта 716 п.н.

Праймеры внутреннего контроля (18S рРНК пасленовых) NS. Размер продукта 310 п.н.

#### 1.4. ПЦР-РВ (по Weller et al., 2000)

Праймеры:

- RS-I-F 5'-GCA TGC CTT ACA CAT GCA AGT C-3';

- RS-II-R 5'-GGC ACG TTC CGA TGT ATT ACT CA-3';

- B2-I-F 5'-TGG CGC ACT GCA CTC AAC-3';

- B2-II-R 5'-AAT CAC ATG CAA TTC GCC TAC G-3';

- COX-F 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3';

- COX-R 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG AGC CAA AAC TG-3'.

Зонды:



- RS-P 5'-[FAM]-  
AGCTTGCTACCTGCCGGCGAGTG-  
[TAMRA]-3';  
- B2-P 5'-[VIC]-  
TTCAAGCCGAACACCTGCTGCAAG-  
[TAMRA]-3';  
- COX-P:5'-[VIC]-  
TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT-  
[TAMRA]-3'.

Праймеры и зонд RS специфичны ко всем известным штаммам комплекса *Ralstonia solanacearum*.

Праймеры и зонд B2 специфичны ко всем известным штаммам *Ralstonia solanacearum* биовар 2 (раса 3) и как минимум к одному штамму биовара 1 (расы 1).

ПЦР-анализ в реальном времени с праймерами и зондами COX амплифицирует ген цитохромоксидазы растений в качестве внутреннего положительного контроля амплификации.

1.5. ПЦР с коммерческими наборами ОАО «Агродиагностика» ([www.agrodiagnostica.ru](http://www.agrodiagnostica.ru)) и ЗАО «Синтол» ([www.syntol.ru](http://www.syntol.ru))

#### 1.6. Секвенирование последовательностей ДНК

1.6.1. Участок гена *egl* (эндоглюканаза) длиной 750 п.н., амплифицируемого следующими праймерами:

- Endo-F = 5'  
ATGCATGCCGCTGGTCCGCGC 3';  
- Endo-R = 5'  
GCGTTGCCCGGCACGAACACC 3'.

1.6.2 Участок гена 16S рРНК длиной 500 п.н, амплифицируемый универсальными праймерами 8UA\_519B:

- 8UA forward: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3';  
- 519B reverse: 5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'.

#### 2. Серологические методы:

Иммунофлуоресцентный анализ с коммерческими наборами фирм «Adgen» (Великобритания) ([www.adgen.com](http://www.adgen.com)), «Loewe Biochemica GmbH» (Германия) ([www.loewe-info.com](http://www.loewe-info.com)).

3. Классические микробиологические методы:

3.1. Изоляция на селективную среду SMSA.

3.2. Биохимические тесты.

4. Тест на патогенность на молодых растениях томата.

Для установления точного диагноза необходимо использовать не менее трех методов, основанных на разных биологических принципах.

#### Ссылки на основные источники информации по выявлению и идентификации:

1 СТО ВНИИКР 4.009-2013 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации» и «Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.».

2. OEPP/EPPO (2004) PM 7/21 (1): *Ralstonia solanacearum*. Diagnostic protocols for regulated pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, pp. 173-178.

3. Pstrik K.H. and Maiss E. (2000) Detection of *R. solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. J. Phytopathology 148; 619-626.

4. Pstrik K.H., Elphinstone J.G. and Pukall R. (2002) Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. European Journal of Plant Pathology 108, 831-842.

5. Seal S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels (1993) Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139: 1587-1594.

6. Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N. & Stead D.E. (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan PCR. Bulletin OEPP / EPPO Bulletin 30, 381-384.