

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al.

Бактериальный ожог риса

Распространение:

Регион ЕОКЗР: отсутствует.

Азия (очень широко распространен): Очень широко распространен в Бангладеш, Вьетнам, Камбоджа, Китай, Индия, Индонезия, Иран, КНДР, КНР, Лаос, Малайзия, Мьянма, Непал, Пакистан, Таиланд, Тайвань, Филиппины, Шри-Ланка, Япония.

Африка: Бенин, Буркина-Фасо, Бурунди, Габон, Камерун, Мали, Нигер, Сенегал, Того, Уганда.

Северная Америка: Мексика, США (Луизиана, Техас).

Центральная Америка и Карибский бассейн: Гондурас, Коста-Рика, Панама, Сальвадор.

Южная Америка: Боливия, Венесуэла, Эквадор.

Океания: Австралия (северные территории).

Поражаемые растения:

Основным растением-хозяином является рис *Oryza sativa*. Бактерии поражают также ряд злаковых сорняков и незначительное число культивируемых злаков Poaceae: *Brachiaria mutica*, *Cenchrus ciliaris*, *Cyperus difformis*, *C. rotundus*, *Cynodon dactylon*, *Echinochloa crus-galli*, *Leersia* spp. (*Leersia hexandra*, *L. oryzoides*), *Leptochloa mucronata*, *Paspalum scrobiculatum*, *Zizania aquatica*, *Z. latifolia*, *Z. palustris* и *Zoysia japonica*.

Симптомы поражений:

Бактериальный ожог риса встречается в трех формах: листового ожога, «крзек» (увядания) и пожелтения.

В случае *листовой формы* на концах и по краям листьев, а также вдоль центральной жилки растений риса через 3-4 недели после высадки появляются мелкие палево-зеленые или серо-зеленые водянистые штрихи, со временем сливающиеся в желтовато-белые полосы, при этом их края становятся волнистыми. При сильном поражении весь лист

становится беловатым или сероватым и затем отмирает. Эти повреждения могут развиваться на одной или обеих сторонах листьев, а иногда и по жилкам. Такие симптомы на листьях обычно проявляются в стадии максимального кущения и позже. На пораженных листьях могут выступать капли экссудата желтого цвета. При сильном поражении рисовое поле приобретает желтовато-белый, а позже серовато-белый цвет из-за развития на пораженных растениях сапрофитных грибов. Поражаться могут как отдельные листья и стебли, так и все растение. У более чувствительных сортов могут поражаться листовые влагалища и соломины. При сильном поражении растения может наблюдаться пустозерность метелок риса.

Системное заражение, известное как форма «крзек» (*увядание*), наиболее вредоносно (Reddy, 1984). Оно проявляется в увядании растений риса в возрасте от 1 до 6 недель после пересадки и их гибели в связи с закупоркой сосудов растения бактериальной массой. Больные стебли нередко ломаются, при сильном заражении могут полегать целые плантации. Выжившие растения выглядят низкорослыми и желтоватыми. Желтые или бледно-желтые листья обусловлены системными инфекциями, которые появляются в фазу кущения.

Форма *пожелтения* отмечается при позднем заражении на листьях созревающих растений, причем заболевание поражает только молодые листья. Бактерии, как правило, обнаруживаются в междоузлиях и в верхних частях пораженных стеблей, но не в самих листьях (Ou, 1985). В этой стадии болезнь трудно отличить от бактериальной полосатости риса.

Пути распространения:

Единственным источником заражения при переносе в свободные регионы является зараженный семенной

материал. Бактерии могут сохраняться как в эндосперме зерна, так и в рисовой шелухе. При этом сроки сохранения бактерий колеблются от двух месяцев до года. На незначительные расстояния возможен перенос возбудителя зараженным растительным материалом, самосевом риса, зараженными соломой и половой, хозяевами-сорняками. Кроме того, распространение происходит ветром, дождем, но преимущественно водой для орошения и при наводнениях. Существует мнение о возможности переноса возбудителя бактериального ожога насекомыми. Доказано, что клоп *Leptocorsia acuta* Thun. является переносчиком бактерий.

Методы выявления и идентификации:

Посевы риса обследуют ежегодно в один срок – в фазу кущения по одной ступенчатой диагонали.

Образец для лабораторного анализа на выявление *X. oryzae* может представлять собой единичный экземпляр или несколько целых растений-хозяев или их частей с наиболее типичными признаками заболевания (листовые пластинки, фрагменты стеблей, метелки), а также семена (образец 400 семян). С одного растения можно отбирать образцы с нескольких пораженных частей.

Выделять бактерии рода *Xanthomonas* из растений предпочтительно из образцов с симптомами на среды PSA, NBY, GF agar (Agarwal et al., 1989; Sakthivel et al., 2001). Бактерии также могут быть выделены на питательном агаре (NA), но рост колоний будет очень медленным; на полуселективной питательной среде, например модифицированной среде XOS (mXOS) (Di et al., 1991; Gnanamanickam et al., 1994).

Пробы из семян (400 шт.) измельчают до муки грубого помола, затем суспензируют в 200 мл стерильного хлорида натрия (0,85%) (стерильный физиологический раствор) (Agarwal et al., 1989; Mortensen et al., 1994). Проводят посев суспензии на чашки с питательным

агаром и инкубируют при температуре $27 \pm 2^\circ \text{C}$ в течение 3-5 дней. Колонии на среде GF очень маленькие, желтые и блестящие, а колонии на среде mXOS имеют характерный розовый цвет, блестящие и слизистые (Di et al., 1991).

Для подтверждения наличия возбудителя проводят тест на патогенность на рисе. Результаты биохимических тестов и тестов на патогенность проводят для разделения патоваров *Xanthomonas oryzae*.

Два патовара *X. oryzae* отличаются друг от друга симптомами инфицирования (Ou, 1985), фенотипическими признаками (Vera Cruz et al., 1984; Vauterin et al., 1995), по разделению белков в полиакриламидном геле на электрофорезе (Mew, Vera Cruz et al., 1979; Kersters et al., 1989), по серологии (Benedict et al., 1989) и фаготипированию (Swings и Civerolo, 1993).

В качестве методов диагностики рекомендуется использовать анализы на основе классической ПЦР с праймерами, специфичными для рода *Xanthomonas*, видоспецифичными праймерами, ПЦР «в реальном времени» для разделения двух близкородственных видов *X. oryzae* pv. *oryzae* и *X. oryzae* pv. *oryzicola* с видоспецифичными праймерами и зондом.

Классическую ПЦР проводят с парой праймеров **Xnth 804F/1405R** – специфичной для межгенного участка Xcc0007-tonB (Tsygankova et al., 2004) всех бактерий рода *Xanthomonas* (размер продукта 623 п.о.).

Xnth 804 F 5-CGC (M) G(S) (S)
GTGATGGACAA GC-3

XnthR 1405 5-
CCCTGGTTCCTGGCATCRTAG TCA-3

Для специфической идентификации *X. o.* pv. *oryzae* и *X. o.* pv. *oryzicola* используют праймеры **TXT/TXT-4R** (Sakthivel et al., 2001), рекомендованные протоколом ЕОКЗР (EPPO, 2007).

TXT 5-GTCAAGCCAACTGTGTA-3,
TXT4R 5-CGTTCGGCACAGTTG-3

Для постановки ПЦР «в реальном времени» рекомендуется использовать праймеры **X.o.F/ X.o.R** и зонд **X.or. P**, (ЗАО Синтол, Москва), специфичные для *Xanthomonas oryzae* (Егорова и др., 2014) и разработанные в ФГБУ «ВНИИКР».

XOF 5-ATGCCGATCACCATGCCGAT-3
XOR 5-TGGCCTTGTCGTACGAGCTC-3
X.or.-P R6G-CAC CGA GAA CGC GCC TGC C-RTQ2

Для разделения двух близкородственных видов *X. oryzae* pv. *oryzae* и *X. oryzae* pv. *oryzicola* используют ПЦР «в реальном времени» с использованием TaqMan-зонда, разработанного Wen-Jun Zhao (Zhao et al., 2007) (Vera Cruz et al., 1984; Lelliott и

Stead, 1987; Mew и Mistra, 1994; Schaad et al., 2001). Праймеры **PF/PR** и зонд, содержащий флуоресцентную метку 6-карбоксифлуоресцеина (carboxyfluorescein) (FAM) на 5' конце и гаситель флуоресценции tetramethyl carboxyrhodamine (TAMRA) на 3' конце были разработаны для определения последовательности гена рецептора сидерофора (siderophore receptor gene *cds*), специфичного только для *X. oryzae* pv. *oryzae*.

PF: 5'-GAAT ATCAGCATCGGCAACAG-3

PR: 5'-TACCGGAGCTGCGCGTT-3'

The probe 5'-CATCGCCTGCTCGGCTACCAGC-3'



Хлоротичные полосы на листовых пластинках риса
(T.W. Mew – IRRI, Los Baños (PH))



Саженьцы риса с поражением *X. oryzae* pv. *oryzae*



Симптомы увядания (крезек) на пораженных растениях риса



Полегание пораженных
X. oryzae pv. *oryzae* стеблей риса

(T.W. Mew – IRRI, Los Baños (PH))



Экссудат на листовой
пластинке растения риса

Ссылки на основные источники информации по выявлению и идентификации:

1. Егорова М.С., Игнатов А.Н., Мазурин Е.С. Усовершенствование методов диагностики возбудителя бактериального ожога риса на основе ПЦР // Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство. – 2014. – № 2. – С. 22-28.

2. Agarwal P.C., Mortensen C.N. & Mathur S.B. Seed-borne diseases and seed health testing of rice // Technical Bulletin Phytopathological Papers No. 30. – Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries & CAB International Mycological Institute (DK/GB). – 1989. – V. 3.

3. Benedict A.A., Alvarez A.M., Berestecky J., Imanaka W., Mizumoto C.Y., Pollard L.W., Mew T.W., and Gonzalez C.F. Pathovar-specific monoclonal-antibodies for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* and for *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* // Phytopathology. – 1989. – V. 79. – P. 322-328.

4. Di M., Ye H.Z., Schaad N.W. & Roth D.A. Selective recovery of *Xanthomonas* spp. from rice seeds // Phytopathology. – 1991. – V. 81 – P. 1358-1363.

5. Gnanamanickam S.S., Shigaki T., Medalla E.S., Mew T.W. & Alvarez A.M. Problems in detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice seed and potential for improvement using monoclonal

antibodies // Plant Disease. – 1994. – V. 78. – P. 173-178.

6. Kersters K., Pot B., Hoste B., Gillis M., & De Ley J. Protein electrophoresis and DNA: DNA hybridizations of xanthomonads from grasses and cereals // Bulletin OEPP/EPPO. – 1989. – V. 19. – P. 51-55.

7. Lelliot R.A., Stead D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. – Oxford etc.: Blackwell Sci. Pul. 1987. – 216 pp.

8. Mew T.W. & Mista J.K. A Manual of Rice Seed Health Testing // IRRI. – Manila (PH). – 1994.

9. Mortensen C.N., Manandhar H.K., Cahyaniati & Haryanti S.E. Pathogenic bacteria associated with rice seed samples from Indonesia and Nepal // Plant Pathogenic Bacteria. – Versailles (France), 8th International Conference, June 9-12. – 1994. – V. 66.

10. OEPP/EPPO. Diagnostics, *Xanthomonas oryzae* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2007. – V. 37. – P. 543-553.

11. Ou S.H. Rice diseases // Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. – England – 1985. – V. 2.

12. Reddy P.R. Kresak phase of bacterial blight of rice. *Oryza*, 1984, 21, 179-187.

13. Sakthivel N., Mortensen C.N. & Mathur S.B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques // Applied

Microbiology and Biotechnology. – 2001. – V. 56. – P. 435-441.

14. Schaad N.W., Jones J.B. and Lacy G. *Xanthomonas* // Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul. – MN. – 2001. – V. 3. – P. 494-495.

15. Swings J.G. & Civerolo E.L. *Xanthomonas* // First edn: Chapman & Hall. – London. – 1993.

16. Tsygankova S.V., A.N. Ignatov, E.S. Boulygina, B.B. Kuznetsov, E.V. Korotkov. Genetic intraspecies relationships in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers // European J. Plant Pathol. – 2004. V. 110. № 8. P. 845-853.

17. Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. Reclassification of *Xanthomonas* – International Journal of systematic bacteriology – 1995, V. 45. P. 472-479.

18. Vera Cruz C.M., Gossele F., Kersters K., Segers P., Van Den Mooter M., Swings J. et al. Differentiation between *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* and the bacterial ‘brown blotch’ pathogen on rice by numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams // Journal of General Microbiology. – 1984. – V. 130. – P. 2983-2999.

19. Zhao W.J., Zhu S.F., Liao X.L., Tan T.W. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe // Molecular Biotechnology. – 2007. – V. 35. – P. 119-127.