

УДК 632.3

## Черная ножка – опасное заболевание картофеля

**М.Д. ЕРОХОВА,**  
аспирант  
Всероссийского НИИ  
картофельного хозяйства  
**Н.В. ДРЕНОВА,**  
старший научный сотрудник  
ФГБУ «ВНИИКР»  
e-mail: maria.erokhova@gmail.com  
e-mail: htt/lnkd.in/2aWrJY

Мокрая (мягкая) гниль картофеля, также называемая черной ножкой или водянистой гнилью стеблей, относится к числу вредоносных бактериальных болезней культуры, активно распространяющихся в последнее время. Черную ножку на вегетирующих растениях картофеля и мягкую гниль клубней вызывают пектолитические бактерии сем. Enterobacteriaceae. Развивающиеся симптомы, независимо от вида вызывающих их бактерий, сходны, различаясь лишь степенью проявления. Наиболее широко распространены *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall) Gardan et al. и *P. carotovorum* susp. *carotovorum* (Jones) Hauben & al. emend. Gardan et al., ранее принадлежавшие к роду *Erwinia* (см. таблицу). Источником сведений об авторах является база данных Национального центра биотехнологической информации NCBI (База данных..., 2013)\*.

Другая группа пектолитических бактерий, поражающих картофель, впервые была обнаружена на хризантеме садовой, позднее из растений других видов с симптомами

мягкой гнили и увядания также были выделены пектобактерии.

В настоящее время вид *E. chrysanthemi* отнесен к роду *Dickeya*, который включает 6 видов. В последние годы были выделены новые штаммы, отличающиеся от них и, вероятнее всего, представляющие новые виды этого рода. Возможно, такое генетическое и серологическое разнообразие изолятов *E. chrysanthemi* не позволяет внести ясность в таксономическое положение бактерии.

Начиная с 2004–2005 гг., на картофеле выявляются вредоносные штаммы, относящиеся к *Dickeya* spp., которые в настоящее время условно обозначают '*D. solani*'. Одним из наиболее вредоносных возбудителей бактериозов картофеля является *Dickeya dianthicola*, вызывающая мягкую гниль клубней картофеля и запасающих органов (клубни, корни, луковицы, клубнелуковицы) у широкого круга растений. В условиях теплого климата у картофеля заболевание может привести к загниванию материнских, а при хранении – дочерних клубней и значительной потере урожая, возможное развитие черной ножки (рис. 1).

Симптомы мягкой гнили появляются в виде небольших, обводненных зон лизиса, которые быстро увеличиваются и приводят к мацерации пораженных тканей (рис. 2). *D. dianthicola* включена в список A2 карантинных организмов, рекомендованных для регулирования и ограничено распространенных на территории стран – членов ЕОКЗР

(A2/53) (ЕОКЗР URL..., 2013). В России карантинного статуса не имеет. Патоген распространен в ряде стран Европы, в США, Израиле, Японии, Новой Зеландии (База данных подкарантинных вредных организмов..., 2013; Map/PlantWise..., 2013). На территории Российской Федерации выявлен в Липецкой (Карлов, 2011), Нижегородской, Воронежской и Московской областях, однако пока не был проведен широкий мониторинг для достоверной оценки его распространенности.

Согласно проведенному анализу фитосанитарного риска (Дренова, Ерохова, 2011) *D. dianthicola* и '*D. solani*' были признаны соответствующими требованиям к организациям для придания им статуса карантинных и предложены для включения в проект Перечня карантинных организмов.

Поскольку национальные сертификационные допуски на семенной картофель разнятся, экономический ущерб, причиняемый заболеванием в разных странах, неодинаков. В Нидерландах из-за строгих допусков к качеству семенного картофеля выбраковка зараженных партий семенных клубней приводит к ежегодным потерям около 30 млн евро (Контроль..., 2005; Prins, 2008).

Зачастую невозможно разграничить потери, вызываемые *Pectobacterium* и *Dickeya*. Проявление симптомов в период проведения сертификации семенных клубней зависит главным образом от преобладающего климата, особенно в начале сезона.

В последние 5 лет потери картофеля, вызванные *Dickeya* spp., существенно увеличились на определенных сортах в европейских странах и Израиле, который является крупным импортером семенного карто-

Возбудители водянистой гнили стеблей и черной ножки картофеля

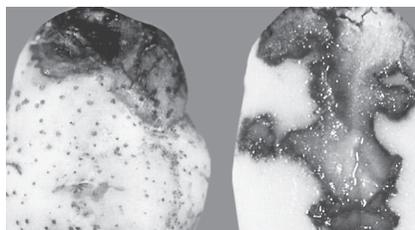
Современное название	Прежнее название
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (van Hall) Hauben et al.	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> (van Hall) Dye (Approved Lists)
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Jones) Hauben et al.	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones) Bergey et al. (Approved Lists)
<i>Dickeya</i> spp. ( <i>D. dianthicola</i> Samson et al., ' <i>D. solani</i> ')	<i>E. chrysanthemi</i> Burkholder et al. (Approved Lists)

\* Список литературы представлен в электронной версии статьи на сайте журнала <http://www.z-i-k-r.ru>.

феля из Европы. При поражении 15 % стеблей в поле потери урожая составляли 20–25 % (Lelliot et al., 1987; Tsror et al., 2009) в странах с теплым климатом. В Финляндии прямые потери урожая в среднем составили 5–6 % (Laurila et al., 2008).

Особая опасность патогена, его способность распространяться с латентно зараженным посадочным материалом, схожесть симптомов с другими заболеваниями картофеля, а также отсутствие устойчивых сортов требуют его эффективной лабораторной диагностики. В связи с распространением *D. dianthicola* на территории стран ЕОКЗР необходимо проведение регламентирующих мероприятий, направленных на предотвращение ее завоза в нашу страну и распространения на ее территории. Особое значение здесь получает лабораторный контроль ввозимого картофеля.

Поскольку многие фитопатогенные вирусы и бактерии остаются в виде латентной инфекции в растительном материале в небольшой концентрации, требуются высокоспецифичные и достоверные методы. В настоящее время видоспецифичная диагностика *Dickeya* spp. разработана недостаточно, нет общепринятого диагностического



**2. Мягкая гниль клубней картофеля**  
(<http://www.cabi.org/portfolio/0x100/68500.img>)

протокола (ЕОКЗР URL..., 2013). Используют в основном серологические, молекулярные и культурально-морфологические методы диагностики.

**Серологические методы.** В роде *Dickeya* выявлены 10 различных серогрупп. Метод ИФА для анализа семенного картофеля на наличие латентной инфекции *Dickeya* spp. оказался недостаточно чувствительным и специфичным. Антитела к серогруппе 1 позволяли распознать не более 68 % штаммов р. *Dickeya* и в большинстве случаев реагировали против *P. s. carotovora* (Samson et al., 1990). Проблемы низкой специфичности часто возникают при анализе бактерий в растительном материале, почве и воде из-за большого количества

других микроорганизмов, присутствующих в образце, и трудностей при получении достаточно специфичных поликлональных антител.

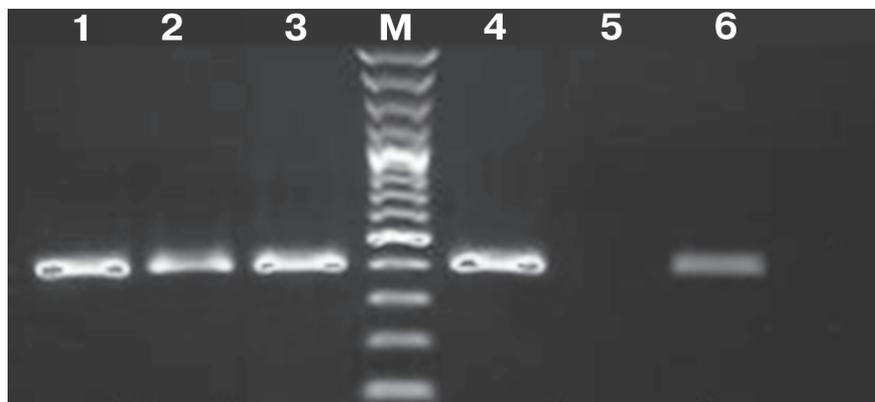
В последние годы в РФ в связи с участвовавшими случаями выявления *Dickeya* spp. на картофеле и с возрастанием ущерба, наносимого данными патогенами, проводятся разработки в области получения отечественных антител к *Dickeya* spp. и создания на их основе коммерческих диагностических наборов для ИФА. В частности, такие исследования проводились в РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева в сотрудничестве с ВНИИ фитопатологии, ВНИИ картофельного хозяйства, ФГБУ «ВНИИКР». Были получены поликлональные антитела к двум оригинальным штаммам *D. dianthicola* (D9, Нижегородская область, картофель, 2009, и D17, Нижегородская область, картофель, 2009) (Карлов, 2011), изолированным на территории РФ, и показана их высокая специфичность к *Dickeya* spp., позволяющая избежать ложноположительных реакций с возбудителями других бактериозов картофеля (Карлов, 2011). Чувствительность метода ИФА с указанными антителами достигала  $2 \times 10^4$ – $10^5$  кл/мл в картофельном экстракте, при этом отмечено более высокое качество сыворотки, полученной на основе штамма D9.

Для повышения чувствительности метода ИФА рекомендуется применять предварительное обогащение образца на специальных средах. В настоящий момент совместно с сотрудниками ВНИИКХ ведется работа по оптимизации применения созданных наборов ИФА для диагностики *D. dianthicola*.

**Молекулярные методы.** В качестве стандартного отборочного метода все чаще используется ПЦР, позволяющий идентифицировать бактерии *Dickeya* до рода (Lumb et al., 1986). В качестве молекулярных классификационных исследований для идентификации изолятов



**1. Пораженное черной ножкой растение картофеля**  
([www.cabi.org/portfolio/210x0/68498.img](http://www.cabi.org/portfolio/210x0/68498.img))



3. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами ADE1/ADE2: 1, 2, 3, 4 – штаммы *Dickeya* spp., 5 – вода, 6 – положительный контроль

*D. dianthicola* применяют анализ последовательностей 16 SpPHK, *recA*, а также REP ERIC, BOX.

Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (Nassar et al., 1996) позволяет идентифицировать патоген до вида. Наиболее эффективный способ идентификации '*D. solani*' – секвенирование генов *recA* (Parkinson et al., 2009) или *dnaX* (Stawiak et al., 2009).

В настоящее время нами оптимизировано применение ПЦР на основе праймеров ADE1/ADE2 как для идентификации чистых культур бактерий, так и для выявления патогена в растительных экстрактах (рис. 3).

**Культурально-морфологические методы.** Одним из главных недостатков серологических и молекулярных методов является их способность обнаруживать нежизнеспособные и/или некультурабельные клетки в растительных тканях, поэтому в схему диагностики фитопатогенных бактерий включают этап изоляции патогена на питательные среды.

Широко используется селективная среда CVP (кристалл-виолет пектат) (Cuppels et al., 1974), а также различные модификации двухслойных сред с пектатом (Vdliya et al., 2005, Нуман et al., 2001). Для изоляции *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* и *Dickeya* spp. (Pérombelon et al., 1986). Недавно было показано, что использование различных сред

на основе селективного вещества индиготина, которое стимулирует образование синего пигмента у бактерий рода *Dickeya*, позволяет отличить их от бактерий *Pectobacterium* spp. (Lee et al., 2006).

В настоящее время доступны коммерческие наборы производства европейских компаний для определения *Dickeya* spp. методами иммуноферментного, иммунофлуоресцентного, ПЦР-анализов.

В целом диагностика данного вида может быть проведена по следующей схеме: родоспецифическая диагностика *Dickeya* spp. в образце с помощью скрининг-тестов (иммуноферментного, иммунофлуоресцентного, ПЦР-анализов) и/или изоляция бактерий на специальные среды с последующей идентификацией изолятов с характерной морфологией до вида с применением преимущественно молекулярных методов (секвенирование последовательностей ДНК, REP-ПЦР, ПДРФ и анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ)).

Система мер по предотвращению проникновения и распространения возбудителей мокрой гнили на территории нашей страны должна включать:

контроль семенного и продовольственного картофеля, а также других растений – хозяев возбудителей

черной ножки при ввозе в страну. Для этого необходимо ввести этих возбудителей в перечень карантинных организмов или в список некарантинных регулируемых организмов;

использование для посадки только семенного материала, выращенного в системе сертификации согласно ГОСТ Р 53136–2008 «Картофель семенной. Технические условия»;

соблюдение севооборота и агротехнических мероприятий, предотвращающих накопление патогенов картофеля в почве, в том числе инспектирование посадок картофеля и, при необходимости, проверка подозрительных образцов в лаборатории.

**Аннотация.** Фитопатогенная бактерия *Dickeya dianthicola* Samson et al., включенная в список A2 ЕОКЗР вызывает опаснейшее заболевание картофеля – черную ножку (мягкую гниль). В статье представлены данные о возбудителях черной ножки (мягкой гнили) *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *Dickeya* spp. (*D. dianthicola* Samson et al., '*D. solani*') и методах их диагностики.

**Ключевые слова.** *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dianthicola*, '*Dickeya solani*', черная ножка картофеля, мягкая гниль, водянистая гниль стеблей картофеля, анализ фитосанитарного риска, диагностика, кристалл виолет пектат, CVP, праймеры ADE1/ADE2.

**Abstract.** Phytopathogenic bacterium *Dickeya dianthicola* Samson et al., listed to A2/53 EPPO and cause harmful disease of potato black leg (soft rot). Data about pathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *Dickeya* spp. (*D. dianthicola* Samson et al., '*D. solani*') are published at the article, about diagnostic methods of detection and identification.

**Keywords.** *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya dianthicola*, '*Dickeya solani*', black leg, soft rot, pest risk assesment/pest quarantine risk, crystal violet pectate, polygalacturonic acid, CVP, *recA*genes.