

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 1, Number 31 (2016), 19 – 22

DETECTION AND IDENTIFICATION OF *RALSTONIA SOLANACEARUM* BY FLASH-PCR

G. K. Nizamdinova

Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan.
 E-mail: Nizamdin13@gmail.com

Keywords: Detection, Format FLASH, DNA, *Ralstonia solanacearum*, culture media,

Abstract. In 2014-2015, in the Almaty region it was surveyed crops to detect bacterial diseases on tomatoes and potatoes.

Selected samples were analyzed by isolating the pathogen in pure culture with further identification by the FLASH format. The analysis found that the isolates of cultural-morphological characteristics and biochemical properties are identical bacteria *Ralstonia solanacearum*.

УДК 632.35

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ *RALSTONIA SOLANACEARUM* МЕТОДОМ FLASH-ПЦР

Г. К. Низамдинова

Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: детекция, формат FLASH, ДНК, *Ralstoniasolanacearum*, питательная среда.

Аннотация. В 2014-2015 гг., в Алматинской области проведено обследование посевов на наличие бактериальных болезней на помидоре и картофеле. Отобранные образцы анализировались путем выделения возбудителя болезни в чистую культуру с дальнейшей идентификацией в формате FLASH. В результате анализа установлено, что выделенные изолятами по культурально-морфологическим признакам и биохимическим свойствам идентичны с бактерией *Ralstonia solanacearum*.

Введение. Для своевременного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности фитопатогенными микроорганизмами сельскохозяйственных культур на разных стадиях их возделывания и переработки крайне необходима детекция и точная идентификация патогена [1]. Предварительный диагноз болезней, вызываемых фитопатогенными бактериями, проводят по выявлению симптомов заболевания, а точную идентификацию возбудителя осуществляют по культурально-морфологическим, биохимическим признакам патогена посредством использования методов микроскопии и культивирования на питательных средах. При этом культурально-морфологические признаки у близкородственных видов фитопатогенных бактерий могут совпадать, а внутри одного вида значительно варьировать. Более того, симптомы болезней могут проявляться нетипично или заболевание может проходить в скрытой форме [2].

Поэтому применение более чувствительных методов является востребованным и обязательным мероприятием в диагностике фитопатогенов. В последние годы для идентификации и детекции фитопатогенных микроорганизмов все чаще применяется метод ПЦР [3].

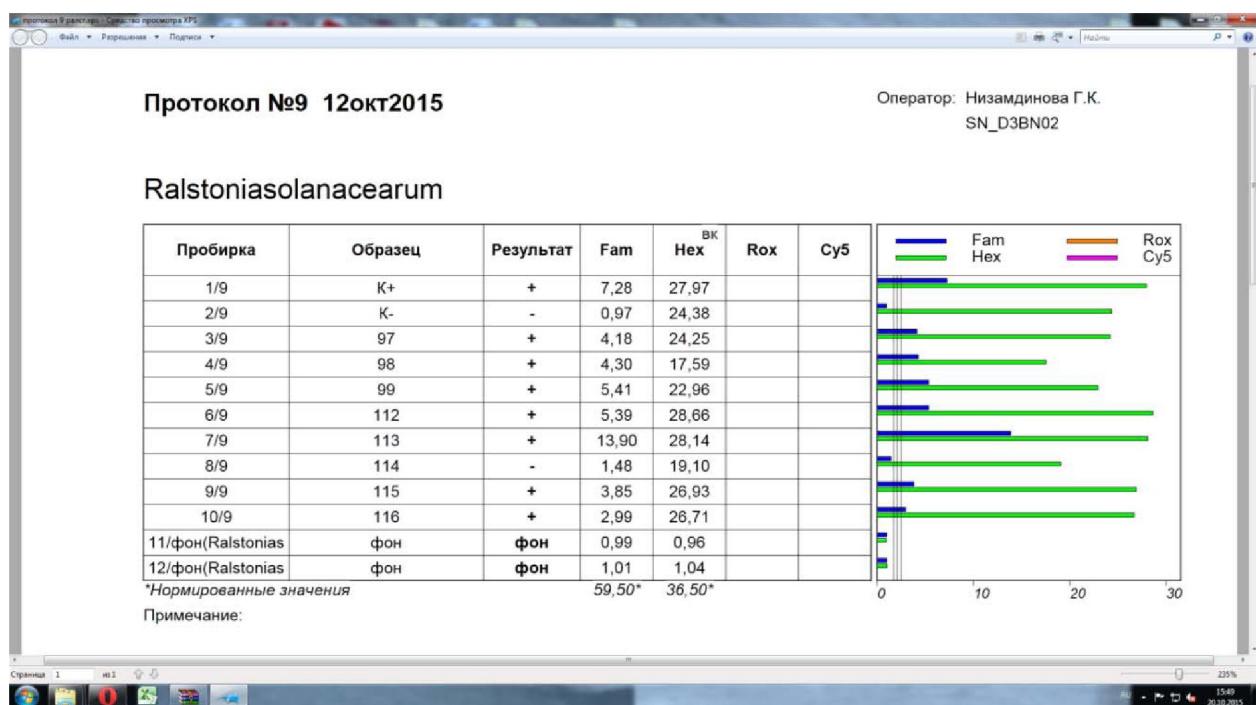
Среди методов, основанных на полимеразной цепной реакции, одним из наиболее адаптированных для практического применения является метод ПЦР с детекцией результатов в формате FLASH (качественная флуоресцентно-гибридизационная полимеразная цепная реакция).

При заражении возбудители настолько заполняют сосуды, что они становятся видны, особенно на молодых побегах и ветвях в виде просвечивающих бурых продольных полос. Иногда аналогичные полосы наблюдаются на жилках листа. Проникновение возбудителя в органы растений чаще происходит через корневую систему при образовании придаточных корней. Здесь и появляются первоначально зоны потемнения, которые со временем расширяются. Попав в растения, бактерии быстро размножаются и заполняют сосуды. Вследствие их закупорки растения начинают увядать [6].

С целью идентификации отобранных 10 штаммов с признаками *Ralstonia solanacearum* детектировались на амплификаторе «Терцик» с помощью набора «Проба ГС» согласно протоколу фирмы-производителя.

Расчет данных проходил автоматически по прилагаемой к флуориметру программе, после чего результаты анализа выводились в виде гистограмм и таблицы на монитор компьютера (таблица).

Результаты анализа образцов картофеля и томата на наличие возбудителя *Ralstonia solanacearum*, 2014-2015 гг.



Из таблицы видно, что образцы под номерами №97-99, выделенные из проб томата, показали положительную реакцию по отношению к *Ralstonia solanacearum*, где сигнал по Fam отмечался выше 4.18, при этом показатель HEX превышал стандарт (17,59).

Образцы, выделенные из проб картофеля, отмеченные как №112-116, также показали положительную реакцию, кроме образца №114, по которому установлен отрицательный результат по отношению к *Ralstonia solanacearum*. Показатели по штамму №113 были в два раза больше по сравнению +K, что свидетельствует об агрессивности штамма. Следует также отметить, что данные образцы картофеля, которые идентифицировались как возбудители бурой гнили, были взяты из местного рынка.

Выводы. Таким образом, установлено, что выделенные изоляты по культурально-морфологическим признакам и биохимическим свойствам идентичны бактерии *Ralstonia solanacearum*.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kristensen, R.; Torp, M.; Kosiak, B. & Holst-Jensen, A. (2005). Phylogeny and toxigenic potential is correlated in Fusarium species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. MycologicalResearch, Vol.109, No.2, pp. 173–186, ISSN 0953-7562.

- [2] Иващенко, В. Г., Шипилова, Н. П., Бучнева, Г. Н. Полевая мико-флора семян пшеницы: о критерии нормы. - Краснодар. 2007. - С. 45-46.
- [3] Lievens, J.C., Rival, T., Iche, M., Chneiweiss, H., Birman, S. (2005). Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **14(5)**: 713--724.
- [4] Абрамова С.А. Автoreферат на тему: Разработка систем идентификации грибов – возбудителей экономически значимых болезней зерновых культур методом ПЦР. С. 5
- [5] European Plant Protection Organization (EPPO). *Ralstonia solanacearum*. OEPP/EPPO Bulletin. 1999;29:325-347.
- [6] ЛитМир - Электронная Библиотека.

REFERENCES

- [1] Kristensen, R.; Torp, M.; Kosiak, B. & Holst-Jensen, A. (2005). Phylogeny and toxicogenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research*, Vol.109, No.2, pp. 173–186, ISSN 0953-7562.
- [2] Ivashchenko V.G., Shipilova N.P., Buchneva G.N. Field myco-flora of wheat seeds: the criterion of the norm. - Krasnodar. 2007. - P. 45-46. (in Russ.).
- [3] Lievens, J.C., Rival, T., Iche, M., Chneiweiss, H., Birman, S. (2005). Expanded polyglutamine peptides disrupt EGF receptor signaling and glutamate transporter expression in Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **14(5)**: 713--724.
- [4] AbramovS.A. Avtoreferat on the theme: Development of systems of identification of fungi - agents of economically important diseases of cereal crops by PCR. P. 5. (in Russ.).
- [5] European Plant Protection Organization (EPPO). *Ralstonia solanacearum*. OEPP/EPPO Bulletin. 1999; 29: 325-347.
- [6] LitMir - Electronic Library.

***RALSTONIA SOLANACEARUM* АУРУ ҚОЗДЫРҒЫШЫН FLASH ӘДІСІМЕН АНЫҚТАУ ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ**

Г. К. Низамдинова

Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: детекция, формат FLASH, ДНК, *Ralstonia solanacearum*, коректік орта.

Аннотация. 2014-2015 жылдары Алматы облысындағы қызанак және картоп егістерінде бактериялық аурудын бар-жоқтығын анықтау үшін тексерулер жүргізілді. Алынған ұлгілер таза культураға ауру қоздырғыштарды белу жолымен талданды және одан ары қарай FLASH форматында анықталды. Талдау нәтижесінде белгініп алынған изолят культуралды-морфологиялық белгілері және биохимиялық қасиеттері бойынша *Ralstonia solanacearum* бактериясымен бірдей болғандығы анықталды.

Поступила 19.01.2016г.