

Оригинальная статья / Original article

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-138-145>
УДК:635.21:632.38

Д.А. Доморацкая^{1,2*}, О.Ю. Словарева^{2,3},
Е.А. Калашникова⁴, Р.Н. Киракосян¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К.А. Тимирязева»
127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений»
140150, Россия, Московская область, Раменский м.о., пгт. Быково, ул. Пограничная, д. 32

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

*Автор для переписки: danadomratskaya@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансировании ФГБУ «ВНИИР». Работа выполнена при финансировании ФГБУ «ВНИИР».

Вклад авторов: Доморацкая Д.А.: проведение исследования, создание рукописи и ее редактирование. Словарева О.Ю.: формальный анализ, создание черновика рукописи. Киракосян Р.Н.: руководство исследованием, создание рукописи и ее редактирование. Калашникова Е.А.: создание рукописи и ее редактирование.

Конфликт интересов. Калашникова Е.А. является членом редакционной коллегии журнала «Овощи России» с 2017 года, но не имеет никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляют.

Для цитирования: Доморацкая Д.А., Словарева О.Ю., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Разработка схемы идентификации возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. и ее апробация в диагностической лаборатории. *Овощи России*. 2026;(3):138-145.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-138-145>

Поступила в редакцию: 14.05.2026

Принята к печати: 30.06.2026

Опубликована: 27.07.2026

Dana A. Domratskaya^{1,2*}, Olga Yu. Slovarova^{2,3},
Elena A. Kalashnikova⁴, Rima N. Kirakosyan¹

FSBSI "FSC of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaik"
30, Volozhenina st., Timiryazevsky stl.,
Ussuriysk, Russia, 692539

*Corresponding Author: slava.kazachenok@bk.ru

Funding. This work was supported by the Federal State Budgetary Institution "VNIIR".

Authors' Contribution: Domratskaya D.A.: investigation, writing – review & editing. Slovarova O.Yu.: formal analysis, writing – original draft. Kirakosyan R.N.: supervision, writing – review & editing. Kalashnikova E.A.: writing – review & editing.

Conflict of interest. Kalashnikova E.A. has been a member of the editorial board of the Journal "Vegetable crops of Russia" since 2017, but had nothing to do with the decision to publish this manuscript. The manuscript passed the journal's peer review procedure. The authors declare no other conflicts of interest.

For citation: Domratskaya D.A., Slovarova O.Yu., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. Development of an identification scheme for the brown rot of potato *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. and its validation in a diagnostic laboratory. *Vegetable crops of Russia*. 2026;(3):138-145. (In Russ.)
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2026-3-138-145>

Received: 14.05.2026

Accepted for publication: 30.06.2026

Published: 27.07.2026

Разработка схемы идентификации возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. и ее апробация в диагностической лаборатории

Check for updates



РЕЗЮМЕ

Актуальность. Исследование посвящено разработке схемы выявления и идентификации бактерии *Ralstonia solanacearum* – возбудителя бурой гнили картофеля, входящего в комплекс видов *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii*). Данный патоген поражает свыше 200 видов растений, включая экономически значимые культуры (картофель, томат, перец, баклажан), и включен в список карантинных организмов, отсутствующих на территории Российской Федерации. Цель работы: создание и апробация схемы лабораторной диагностики *R. solanacearum* для фитосанитарного контроля подкарантинной продукции.

Материал и методика. Методы, использованные в работе: метод подготовки проб (экстракция в фосфатно-солевом буфере с центрифугированием), ПЦР-анализ (ПЦР-РВ с использованием праймеров RS-I-F/RS-II-R/RS-P и коммерческого набора, ПЦР с детекцией результатов электрофорезом с праймерами RS-1-F/RS-1-R (RS-3-R)).

Результаты. Была разработана оптимизированная схема по идентификации и выявлению возбудителя бурой гнили. Схема апробирована на 242 образцах подкарантинной продукции (картофель, розы, пионы, бананы), поступивших в диагностическую лабораторию в 2025 году. Результаты показали отсутствие бактерий комплекса *R. solanacearum* в образцах из Российской Федерации и выявили 14 случаев заражения клубней картофеля из импортных партий. При идентификации положительных образцов с помощью видоспецифичных праймеров RS-1-F/RS-1-R подтверждено присутствие *R. solanacearum* (*sensu stricto*).

Заключение. Ложноположительных и ложноотрицательных реакций в ходе апробации всех использованных тестов в рамках разработанной схемы зафиксировано не было, что свидетельствует об их 100% специфичности в рамках исследования. Итогом работы стало создание надежного алгоритма лабораторного исследования, обеспечивающего быструю и точную диагностику карантинного фитопатогена, что позволяет гарантировать фитосанитарную безопасность и соответствие продукции требованиям импортеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

карантин растений, фитопатогенные бактерии, молекулярно-генетические методы идентификации, выявление, идентификация

Development of an identification scheme for the brown rot of potato *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. and its validation in a diagnostic laboratory

ABSTRACT

Relevance. The study is devoted to developing a scheme for the detection and identification of the bacterium *Ralstonia solanacearum* – the causal agent of potato brown rot, which belongs to the *Ralstonia solanacearum* species complex (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii*). This pathogen affects over 200 plant species, including economically important crops (potato, tomato, pepper, eggplant), and is listed as a quarantine organism absent from the territory of the Russian Federation. Objective: to create and test a laboratory diagnostic scheme for *R. solanacearum* for phytosanitary control of regulated products.

Material and methods. Methods used in the study: sample preparation method (extraction in phosphate-buffered saline with centrifugation), PCR analysis (real-time PCR using primers RS-I-F/RS-II-R/RS-P and a commercial kit; PCR with electrophoretic detection using primers RS-1-F/RS-1-R (RS-3-R)).

Results. An optimized scheme for the identification and detection of the brown rot pathogen was developed. The scheme was tested on 242 samples of regulated products (potato, roses, peonies, bananas) submitted to the diagnostic laboratory in 2025. The results showed the absence of *R. solanacearum* complex bacteria in samples from the Russian Federation and revealed 14 cases of potato tuber infection in imported batches. Identification of positive samples using species-specific primers RS-1-F/RS-1-R confirmed the presence of *R. solanacearum* (*sensu stricto*).

Conclusion. No false-positive or false-negative reactions were recorded during the testing of all used assays within the framework of the developed scheme, indicating their 100% specificity within the study. The outcome of the work is the creation of a reliable laboratory testing algorithm that ensures rapid and accurate diagnosis of the quarantine phytopathogen, thereby guaranteeing phytosanitary safety and compliance of products with importer requirements.

Keywords: plant quarantine, phytopathogenic bacteria, molecular genetic identification methods, detection, identification

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карантин растений, фитопатогенные бактерии, молекулярно-генетические методы идентификации, выявление, идентификация

Введение

Буря гниль картофеля – возбудитель *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (*R. solanacearum*), в современной классификации рассматривающийся как комплекс видов *Ralstonia solanacearum* (*Ralstonia solanacearum* species complex), впервые выявлена в США в 1890 году на растениях томата, в настоящее время является широко распространенным заболеванием с постоянно расширяющимся ареалом обитания и кругом растений-хозяев¹.

Ранее комплекс видов *Ralstonia solanacearum* рассматривался как совокупность отдельных изолятов одного вида бактерии. Учитывая их биохимическое и патогенное разнообразие, выделялись 5 биоваров (bv.) и 5 рас, связь между которыми прослеживалась не всегда [1, 2, 3]. Применение методов генетического фенгпринтинга, секвенирования 16S рПНК, межгенного участка 16-23S, а также генов полигалактуроназы и эндоглюканазы позволило разделить все штаммы на 4 филоотипа (I – азиатские штаммы, II – южноамериканские, III – африканские высокогорные, IV – происходящие из Индонезии, Японии и Австралии), внутри которых насчитывается 23 секвевара [4, 5, 6, 7]. Поскольку ДНК-ДНК-гибридизация показывала сходство между некоторыми группами штаммов часто ниже 70%, Феган и Прайор [8] предложили рассматривать *R. solanacearum* не как один полиморфный вид, а видовой комплекс. Комплекс разделен на 3 вида: *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. (sensu stricto), *Ralstonia pseudosolanacearum* Safni et al. (*R. pseudosolanacearum*) и *Ralstonia syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. (*R. syzygii*). Новое разделение видов совпадает с предыдущей классификацией филоотипов: *R. pseudosolanacearum* (= филоотипы I и III), *R. solanacearum* (= филоотип II) и *R. syzygii* (= филоотип IV) [9, 10, 11, 12].

Основным путем распространения *R. solanacearum* на дальние расстояния является семенной и посадочный материал. В природе патоген распространяется с грунтовыми и поверхностными водами, почвой и растительными остатками [13, 14, 15, 16].

Патоген включен в список A1 в Гвинее, Иране, Сербии, Швейцарии, Украине, в список A2 – в Аргентине, Бразилии, Грузии, Великобритании, ЕС, в список карантинных регулируемых организмов – в Марокко, Тунисе, Китае². В Российской Федерации фитосанитарный статус возбудителя бурой гнили картофеля определяется как карантинный организм, отсутствующий на территории страны³.

Основными растениями-хозяевами бурой гнили картофеля являются растения семейства Пасленовые, среди которых наиболее экономически значимыми являются картофель, перец, баклажан и томат. Фитопатоген может заражать свыше 200 видов растений из 49 семейств, преимущественно тропических и субтропических культур².

С целью профилактики заноса на территорию Российской Федерации опасного бактериоза, а также

обеспечения соответствия состояния подкарантинной продукции фитосанитарным требованиям, необходимо проводить быструю и точную лабораторную диагностику, а также фитосанитарный мониторинг посевов.

Для решения этой задачи требуется применение оптимизированных методов подготовки проб и ПЦР-анализа в соответствии со специальными нормативными документами.

На данный момент в Российской Федерации в большинстве диагностических фитосанитарных лабораторий для выявления и идентификации возбудителя бурой гнили в подкарантинной продукции используются СТО ВНИИКР 4.009-2013⁴ и диагностический протокол РМ 7/21 [5]. Представленные в данных нормативных документах схемы исследований являются применимыми, однако они избыточны – для подтверждения заражения специалистам приходится устанавливать жизнеспособность бактерий в материале, тогда как на практике одно наличие генетического материала патогена уже свидетельствует о наличии инфекции в связи с эндогенным характером колонизации растения возбудителем бурой гнили картофеля. В вышеуказанных схемах выявления и идентификации помимо анализов на основе ПЦР указаны такие методы обязательных исследований, как иммунофлуоресцентный анализ, морфологический анализ колоний бактерий на специализированной селективной питательной среде, тесты на патогенность, биохимический анализ чистых культур бактерий. Данные методы анализа являются времязатратными и дорогими по сравнению с методами на основе ПЦР, которые хотя и не могут подтвердить жизнеспособность патогена, но являются достаточно чувствительными и селективными для достоверного выявления заражения подкарантинной продукции возбудителем бурой гнили картофеля, основываясь на наличии его генетического материала.

Цель исследования заключалась в разработке схемы выявления и идентификации *R. solanacearum* и ее апробации в диагностической лаборатории для обнаружения патогена в подкарантинной продукции.

Методы

Объектами исследования являлись типовые штаммы возбудителя бурой гнили картофеля (комплекс видов): *R. solanacearum* 0423^T (= CFBP 2047), *R. pseudosolanacearum* 0499^T (= CFBP 6424), *R. syzygii* 0421^T (= CFBP 7288), и образцы подкарантинной продукции в виде частей растений-хозяев патогена, в частности растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.), роз (*Rosa* spp. L.), пионов (*Paeonia* spp. L.) и бананов (*Musa* spp. L.). Схему лабораторного исследования образцов для идентификации патогена разрабатывали, опираясь существующие нормативные документы и исследования о выявлении и идентификации целевых бактерий, которые включали в себя оптимизацию методов подготовки проб и тестов на основе ПЦР [1, 17].

¹ Буря гниль: история открытия и специализация возбудителя // АгроСборник.ру. URL: <https://agrosbornik.ru/bolezni-kartofela/430-2011-10-29-15-50-30.html>

² *Ralstonia solanacearum* (RALSSO) // EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO>

³ Приказ Минсельхоза России от 15 декабря 2014 г. № 501 «Об утверждении Перечня карантинных объектов» // Официальный сайт Россельхознадзора. URL: <https://fsvps.gov.ru/prikaz-minselhoza-rossii-ot-15-12-2014-n-501-ob>

⁴ СТО ВНИИКР 4.009-2013 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации»

Образцы для исследования были отобраны в соответствии с ГОСТ 12430-2019⁵. Образец надземных частей растений картофеля представлял собой от 5 до 15 стеблей с листьями, образец клубней картофеля – 200 клубней. Образец саженцев роз представлял собой от 5 до 10 растений, укорененных или с открытой корневой системой, образец подземных частей пиона – от 5 до 10 корневищ.

Подготовку аналитических проб растительного материала роз, пионов, бананов и надземных частей картофеля проводили, добавляя к 5 г измельченных стерильными скальпелем или ножницами тканей образца 30 мл фосфатно-солевого буфера (phosphate-buffered saline – PBS) [18]. Смесь встряхивали на орбитальном шейкере Unimax 2010 («Heidolph Scientific Products GmbH», Германия) 1 ч при комнатной температуре, используя режим 200 rpm, затем жидкую часть пробы пропускали

Идентификацию патогена проводили с использованием праймеров для ПЦР-PB RS-I-F/RS-II-R/RS-P [19] и коммерческого набора «Бурая бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* (RT)», ООО «АгроДиагностика» (Россия); обе тест-системы специфичны для всего комплекса видов *R. solanacearum*. С ДНК образцов, показавших положительный результат с обоими тестами, проводили дополнительный ПЦР-тест с детекцией результатов методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (с интеркалирующим красителем бромистый этидий) с видоспецифичными олигонуклеотидами RS-1-F/RS-1-R (или RS-3-R) ⁶, где обратный праймер RS-1-R специфичен для вида *R. solanacearum* (sensu stricto), а обратный праймер RS-3-R – для вида *R. pseudosolanacearum*. ПЦР проводили согласно условиям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1. Используемые олигонуклеотиды, состав ПЦР смеси и условия проведения ПЦР-анализа
Table 1. Oligonucleotides used, PCR mix composition, and PCR analysis conditions

Олигонуклеотиды	ПЦР-смесь	Амплификатор	Условия	Источник
RS-I-F/RS-II-R/RS-P	15,9 мкл воды, 5,0 мкл 5X qPCRmix-HS1, по 0,75 мкл праймеров в концентрации 10 пмоль, 0,5 мкл зонда в концентрации 5 пмоль, 0,1 мкл смеси для внутреннего положительного контроля ² и 2,0 мкл ДНК	CFX Opus 96 ⁴	95 °C – 5 мин., далее 45 циклов: 15 сек. – 95°C, 45 сек. – 60°C	[19]
RS-1-F/RS-1-R (или RS-3-R)	11 мкл воды, 5,0 мкл 5X ScreenMix, ЗАО «Евроген» (Россия), по 2 мкл праймеров в концентрации 10 пмоль и 5,0 мкл ДНК ³	C1000 Touch ⁴	95°C – 5 мин., далее 35 циклов: 15 сек. – 95°C, 30 сек. – 58°C, 45 сек. – 72°C, после 5 мин. – 72°C	7

¹ЗАО «Евроген», Россия; ²ЗАО «Синтол», Россия; ³Реакция внутреннего положительного контроля проводилась с праймерами Mus714F/Mus714R, специфичными к фрагменту гена 1700042G15Rik не кодирующей последовательности ДНК мыши [20]; 4BIO-RAD (США)

через фильтр с размером пор 3-5 мкм и центрифугировали при 10000 g 10 мин. с охлаждением до 4°C (центрифуга Cence H1750R, «Hunan Xiang Yi Laboratory Instrument Development Co., Ltd.», Китай). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 1 мл PBS [17].

Подготовку аналитических проб подземных частей (клубней) картофеля проводили, добавляя к 25-50 г (в зависимости от размера образца) вырезанных стерильным скальпелем тканей вблизи сосудистого пучка клубня 50 мл PBS. Смесь встряхивали на орбитальном шейкере 4 ч при комнатной температуре, используя режим 100 rpm или инкубировали в течение 16 ч в холодильнике при температуре +4°C, затем жидкую часть пробы пропускали через фильтр с размером пор 3-5 мкм в пробирку объемом 50 мл и центрифугировали при 10000 g 10 мин. с охлаждением до +4°C. Надосадочную жидкость удаляли, осадок суспендировали в 1 мл PBS [17].

Для выделения ДНК из аналитических проб использовали коммерческий набор «Проба-ГС», ООО «АгроДиагностика» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные ПЦР-продукты после проведения ПЦР с праймерами RS-1-F/RS-1-R (или RS-3-R) и их электрофореза документировали при помощи системы Gel Doc XR+, BIO-RAD (США). Для пары RS-1-F/RS-1-R размер ПЦР-продукта составил 718 пар оснований (п.о.), для пары RS-1-F/RS-3-R – 716 п.о.

В качестве положительных контролей амплификации при ПЦР-тестировании использовали штаммы *R. solanacearum* 0423[†] (= CFBP 2047) и *R. pseudosolanacearum* 0499T (= CFBP 6424).

Результаты

Разработка схемы идентификации *R. solanacearum*

На основании обобщения данных, полученных в ходе исследований по оптимизации способов пробоподготовки и ПЦР-анализов, сформирована схема лабораторного исследования для выявления и идентификации *R. solanacearum* (см. рис. 1). Для каждого элемента разработанной схемы приведено описание, излагаемое ниже.

1. Образец осматривают на соответствие требованиям для бактериологического анализа. Пробы с плесенью

⁵ ГОСТ 12430-2019 Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях

⁶ Commission Directive 2006/63/CE of 14 July 2006 amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Union. 2006. 206;27:36-106.

Таблица 2. Образцы растительного материала,
используемые в работе
Table 2. Plant material samples used in the study

Происхождение	Сорт	Количество, штук образцов
Розы		
Импорт	Артур Белл	1
	Балерина	1
	Блю Герл	1
	Блю Мун	1
	Боника	1
	Вайт Фэйри	1
	Вестерленд	1
	Глория Дей	1
	Грация	1
	Ж.П. Коннел	1
	Ингрид Бергман	1
	Квадра	1
	Квин Элизабет	1
	Клайминг Айсберг	1
	Клайминг Блю Мун	1
	Клайминг Индиголетта	1
	Ландорра	1
	Лилла Вандер	1
	Миниатюр Ориндж	1
	Мистер Линкольн	1
	Московская Красавица	1
	Моцарт	1
	Неуточненный сорт	1
	Нина Вейбул	1
	Паскали	1
	Ред Фэйри	1
	Рейн Лючия	1
	Рубра	1
	Румба	1
	Русская красавица	1
	Сноу Вайт	1
	Стромболи	1
	Флорентина	1
	Фронтенак	1
	Фэйри	2
	Черная Магия	1
	Эшли	1

Продолжение таблицы 2
Continuation of table 2

Происхождение	Сорт	Количество, штук образцов
Картофель		
Импорт	Неуточненные сорта (клубни)	46
Российская Федерация	Неуточненные сорта (надземные части и клубни)	53
	Леди Клэр (надземные части и клубни)	2
	Сорентина (надземные части)	1
	Венетта (надземные части)	3
	Пироль (надземные части)	5
	Сатурн (надземные части)	2
	Гала (клубни)	14
	Коломбо (клубни)	13
	Камелия (клубни)	6
	Примабель (клубни)	5
	Арктика (клубни)	1
	Зоя (клубни)	1
	Краса Мещеры (клубни)	2
	Метеор (клубни)	2
	Садон (клубни)	2
	Удача (клубни)	1
	Гермоза (клубни)	1
	Алания (клубни)	1
	Ариэль (клубни)	1
	Атлетик (клубни)	1
	Вымпел (клубни)	1
	Гулливвер (клубни)	1
	Индиго (клубни)	1
	Кармен (клубни)	3
	Прайм (клубни)	2
	Спринтер (клубни)	1
	Сюрприз (клубни)	1
	Флагман (клубни)	1
	Фламинго (клубни)	2
	Мемфис (клубни)	2
	ВР-808 (клубни)	1
	Инноватор (клубни)	1
	Мелоди (клубни)	1
	Челленджер (клубни)	2

⁷Commission Directive 2006/63/CE of 14 July 2006 amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Official Journal of the European Union. 2006. 206;27:36-106.

Продолжение таблицы 2
Continuation of table 2

Происхождение	Сорт	Количество, штук образцов
Пионы		
Импорт	Неуточненный сорт	1
Российская Федерация	Алые паруса	1
	Барцелла	1
	Корал Чарм	1
	Мэни Хэппи Ритернз	1
	Небесный полет	1
	Неоновое повторение	1
	Нефритовая принцесса	1
	Нефритовый цветок	1
	Орнамент	1
	Ред Чарм	1
Банан		
Импорт	Неуточненные сорта	10
Итоговое количество образцов растительного материала		242

или полностью гнилые не подлежат исследованию.

2. Образец осматривают на признаки симптомов бурой гнили и готовят аналитическую пробу.

3. Выделяют ДНК из аналитической пробы.

4. Проводят один из отборочных тестов ПЦР-РВ. При отрицательном результате делают вывод, что бактерия *R. solanacearum* в образце не выявлена.

5. В случае положительного результата отборочного теста ПЦР-РВ при тестировании ДНК аналитической пробы проводят ПЦР-тестирование ДНК аналитической пробы двумя тестами. В случае отрицательного результата двух тестов, *R. solanacearum* считается не выявленным. В случае положительного результата одного или двух тестов, *R. solanacearum* считается выявленным.

Апробация схемы идентификации *R. solanacearum*

Апробацию разработанной диагностической схемы проводили на образцах растительного материала подкарантинной продукции, поступающей для бактериологического исследования. Всего было протестировано 242 образца, из них 183 – клубни и надземные части растений картофеля различных сортов, 38 – саженцы роз различных сортов, 10 – вегетативные части растений банана различных сортов, 11 – подземные части пионов различных сортов (табл. 2). Все образцы были получены и исследованы в течение 2025 года.

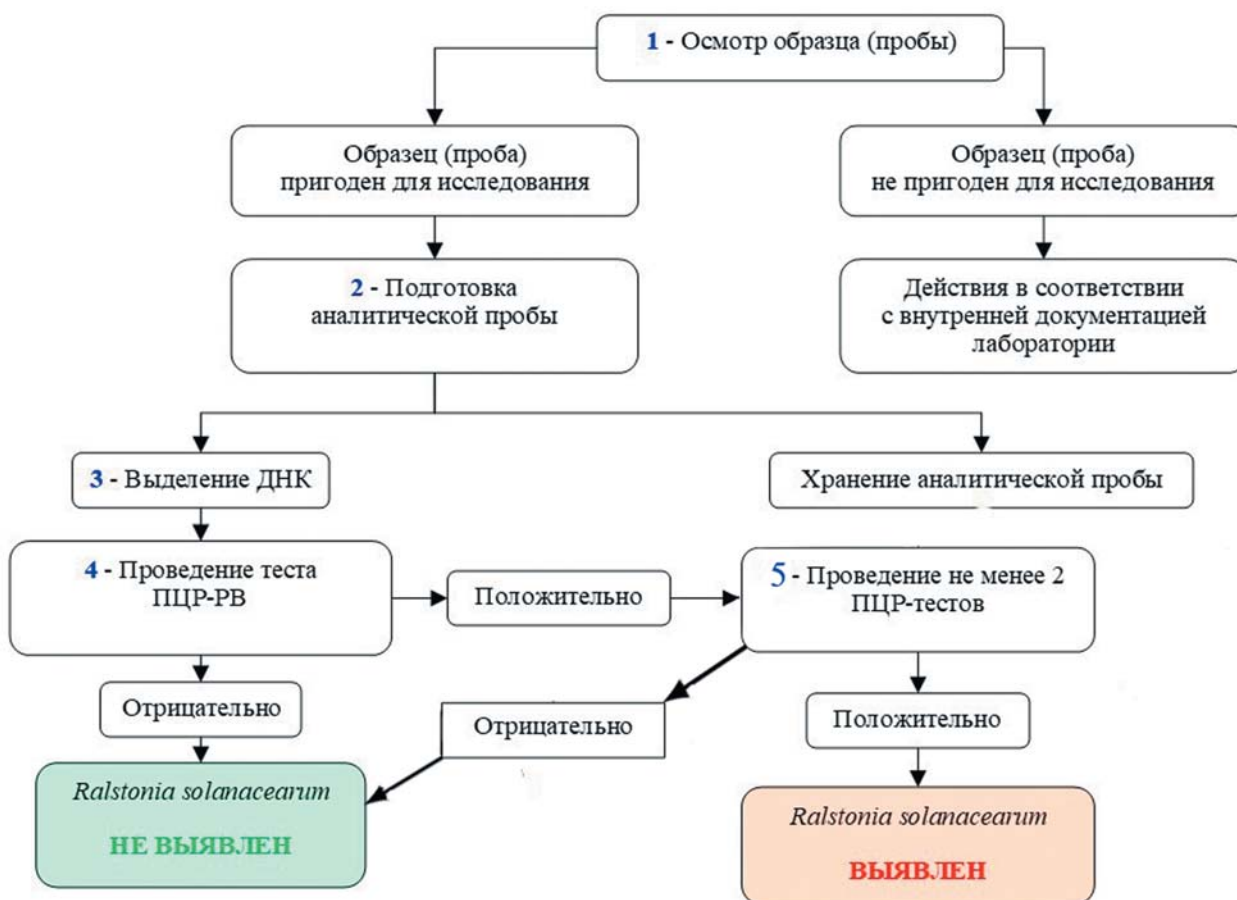


Рис. 1. Схема лабораторного исследования при выявлении и идентификации *Ralstonia solanacearum*
Fig. 1. Scheme of laboratory analysis for the detection and identification of *Ralstonia solanacearum*

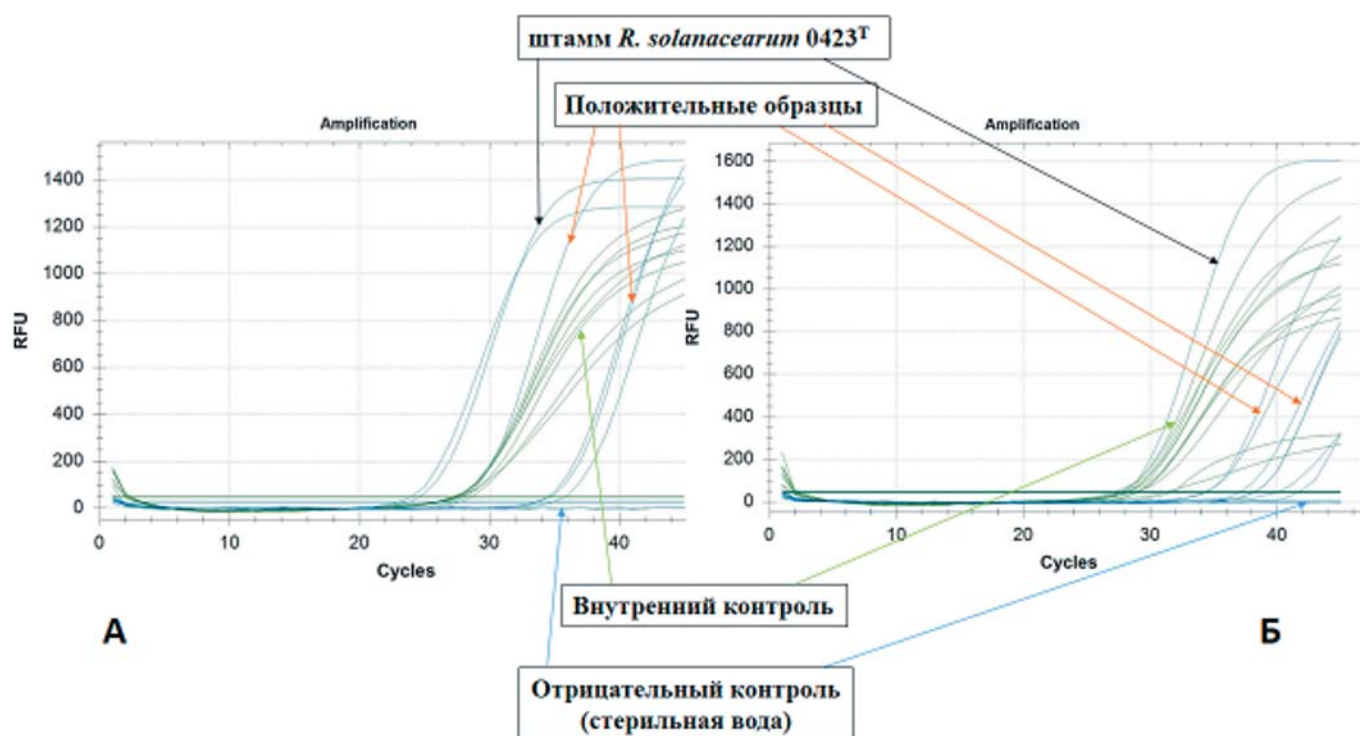


Рис. 2. Результаты тестов с использованием коммерческого набора «Буря бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* (RT)», ООО «АгроДиагностика» (Россия) (А) и праймерной системы RS-I-F/RS-II-R/RS-P (Б)
Fig. 2. Results of tests using the commercial kit «Brown bacterial rot *Ralstonia solanacearum* (RT)» (AgroDiagnostics, Russia) (left) and the primer system RS-I-F/RS-II-R/RS-P (right)

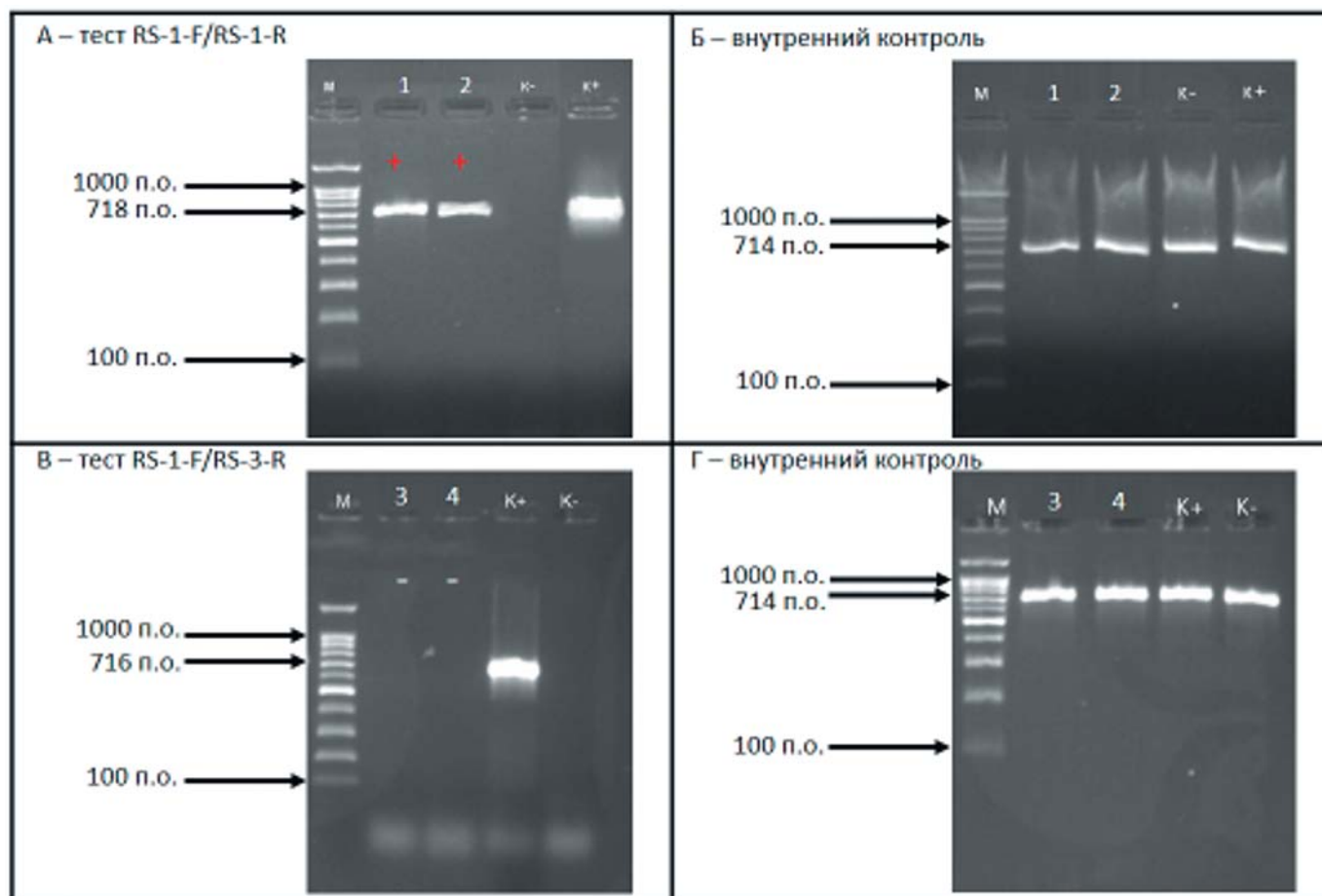


Рис. 3. Электрофореграммы результатов тестов ПЦР с положительными образцами, где 1-4 – ДНК образцов картофеля, K+ – положительный контроль (А, Б – штамм *R. solanacearum* 0423^T, В, Г – штамм *R. pseudosolanacearum* 0499^T), K- – отрицательный контроль (вода), М – маркер длин ДНК 100+ бр, «Евроген» (Россия)
Fig. 3. Electropherogram of PCR test results with positive samples: lanes 1–4 – potato sample DNA; K+ – positive control (A, Б – *R. solanacearum* strain 0423^T; В, Г – *R. pseudosolanacearum* strain 0499^T); K- – negative control (water); М – 100+ bp DNA ladder (Evrogen, Russia)

В результате проведения отборочного ПЦР-теста были получены положительные реакции для ДНК из 14 образцов клубней картофеля неуточненных сортов импортного происхождения (рис. 2); ДНК остальных образцов дала отрицательные реакции, что интерпретировалось как отсутствие заражения возбудителем бурой гнили картофеля.

При проведении подтверждающих ПЦР-тестов с положительно среагировавшими в отборочном тесте ДНК для них также были получены положительные реакции. При проведении ПЦР-тестов с детекцией результатов методом электрофореза положительные реакции были получены только с парой праймеров RS-1-F/RS-1-R, пара праймеров RS-1-F/RS-3-R дала отрицательные результаты; таким образом, было подтверждено выявление инфекции *R. solanacearum* с идентификацией до вида *R. solanacearum* (sensu stricto) (рис. 3).

Обсуждение

Ложноположительных реакций в ходе проведения ПЦР-тестов зафиксировано не было, исходя из однородности значений результатов всех тестов; по получению положительных реакций внутреннего контроля видно, что ингибирования реакции не происходило вне зависимости от разновидности растительного материала образцов (матрицы), что свидетельствует об отсутствии ложноотрицательных результатов проведенных тестов; из вышесказанного следует, что специфичность тестов может быть приравнена к 100% и они могут использоваться в целях диагностики данного фитопатогена.

Точность выявления бактериальной инфекции определяется схемой проведения диагностических тестов. В фитосанитарном контроле зачастую достаточно зафиксировать сам факт заражения (включая наличие только генетического материала патогена без подтверждения его жизнеспособности). Это связано с тем, что методы проверки жизнеспособности требуют затрат времени, а при осуществлении торговли, в особенности скоропортящейся продукцией, требуется быстрое проведение анализа. При этом методы идентификации должны оставаться точными.

Предложенная схема выявления комплекса видов *R. solanacearum* сочетает несколько подходов, обеспечивающих высокую точность и скорость:

1. максимально унифицированная пробоподготовка для разных типов продукции, позволяющая повысить точность и чувствительность дальнейших тестов за счет концентрирования клеток;
2. набор видоспецифичных тестов для выявления *R. solanacearum*: два на основе ПЦР в реальном времени с флуоресцентным зондом и один — с детекцией методом электрофореза.

Разработанная схема практически исключает риск ошибочных результатов. Это подтверждено апробацией на выборке из 242 образцов растительного материала разных культур, как российского, так и зарубежного происхождения.

По результатам работы были сформулированы следующие выводы:

1. В результате изучения возбудителя бурой гнили картофеля – комплекса видов бактерий *R. solanacearum*, была разработана схема лабораторного исследования, включающая метод пробоподготовки и тесты на основе ПЦР-анализа (PB RS-I-F/RS-II-R/RS-P, коммерческий набор «Бурая бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* (RT)», ООО «АгроДиагностика» (Россия), ПЦР RS-1-F/RS-1-R (RS-3-R)).
2. Применение комплекса диагностических тестов согласно разработанной схеме на выборке, состоящей из 242 образцов растительного материала различной подкарантинной продукции, показало отсутствие в образцах из Российской Федерации бактерии комплекса видов *R. solanacearum* и позволило выявить 14 случаев заражения импортной продукции (клубней картофеля).
3. Во всех ПЦР-тестах (с помощью коммерческого набора «Бурая бактериальная гниль *Ralstonia solanacearum* (RT)», ООО «АгроДиагностика» (Россия), праймерных систем RS-I-F/RS-II-R/RS-P и RS-1-F/RS-1-R (RS-3-R)) в ходе их апробации ложноположительных и ложноотрицательных реакций не отмечено, в связи с чем указанные тесты следует считать точными в рамках данного исследования и пригодными к дальнейшему использованию при выявлении и идентификации *R. solanacearum*.

• Литература / References

1. Drenova N.V., Ignatieva I.M., Kondratiev M.O., Shneyder Ye.Yu. Validation of PCR tests with Russian kits for the detection of *Ralstonia solanacearum* sensu lato in plant extracts. *Plant Health and Quarantine*. 2022;1(9):2-20. (In Russ.)
<https://doi.org/10.69536/j3225-4992-5329-t>
2. Tsuchiya K., Horita M. Genetic Diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan. *Bacterial Wilt Disease*. 1998:61-73.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-03592-4_9
3. Champoiseau P.G., Jones J.B., Allen C. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant*

Health Progress. 2009.

<https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0313-01-RV>

4. Sharma K., Iruegas-Bocardo F., Abdurahman A., Alcalá-Briseño R.I. et al. *Ralstonia* Strains from Potato-Growing Regions of Kenya Reveal Two Phylotypes and Epidemic Clonality of Phylotype II Sequevar 1 Strains. *Phytopathology*. 2022;112(10):2072-2083.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-21-0455-R>
5. Villa J.E., Tsuchiya K., Horita M., Natural M. et al. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and hrpB gene sequences. *Journal of General Plant Pathology*. 2005;71(1):39-46. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0156-1>
6. Xiao Z., Li G., Yang A., Liu Z. et al. Comprehensive genome

sequence analysis of *Ralstonia solanacearum* gd-2, a phylotype I sequevar 15 strain collected from a tobacco bacterial phytopathogen. *Frontiers in Microbiology*. 2024;(15):1335081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1335081>.

7. Paudel S., Dobhal S., Alvarez A. M., Arif M. Taxonomy and Phylogenetic Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens*. 2020;9(11):886. doi:10.3390/pathogens9110886

8. Jiang G., Wei Z., Xu J., Chen H. et al. Bacterial Wilt in China: History, Current Status, and Future Perspectives. *Front Plant Sci*. 2017;(8):1549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01549>

9. Shneyder Ye.Yu., Drenova N.V., Karimova Ye.V. Quarantine bacterial diseases of *Ralstonia* species for the Russian Federation. *Plant Health and Quarantine*. 2021;(3):10-26. (In Russ.) <https://doi.org/10.69536/FKR.2021.55.68.001>

10. Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M. et al. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64(9):3087-3103. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>

11. Westenberg M., de Haan E.G. Whole genome characterization of strains belonging to the *Ralstonia solanacearum* species complex and in silico analysis of TaqMan assays for detection in this heterogenous species complex. *European Journal of Plant Pathology*. 2021;159(3):593-613. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02179-7>

12. Paudel S., Dobhal S., Alvarez A. M., Arif M. RSSC-Lineage Multiplex PCR Assay Detects and Differentiates *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum*, *R. syzygii*, and the R3bv2

Subgroup. *PhytoFrontiers*. 2024;4(1):64-76. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-06-23-0079-R>

13. Karim Z., Hossain M.S., Begum M.M. *Ralstonia solanacearum*: A threat to potato production in Bangladesh. *Fundamental and Applied Agriculture*. 2018;3(1):407-421. <https://doi.org/10.5455/faa.280361>

14. Kumar J.S., Umesha S., Prasad K.S., Niranjana P. Detection of quorum sensing molecules and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. *Current Microbiology*. 2016;72(3):297-305. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0953-0>

15. EFSA Panel on Plant Health. Pest categorization of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *EFSA Journal*. 2019;17(2):28. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5618>

16. Blom N.I., Gorkink-Smits P.P., Landman N.M., van de Bilt J.L. et al. *Ralstonia solanacearum* (phylotype II) isolated from Rosa spp. in the Netherlands is closely related to phylotype II isolates from other sources in the Netherlands and is virulent on potato. *European Journal of Plant Pathology*. 2024;171:445-458. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02960-8>

17. European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Standard PM 7/21 (3) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *EPPO Bulletin*. 2022;52(2):225-261. <https://doi.org/10.1111/epp.12837>

18. Phosphate-buffered saline (PBS). Cold Spring Harbor Protocols. 2024. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec108514>

19. Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N. et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(7):2853-2858. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>

20. Mazurin E.S., Kopina M.B., Sherokolava N.A. Quality control of phytosanitary diagnostic results obtained using molecular methods. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2012;(3):31-37. (In Russ.)

Об авторах:

Дана Алексеевна Доморацкая – аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева; младший научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», <https://orcid.org/0009-0005-9362-6655>, SPIN-код: 8506-7534, автор для переписки, danadomoratskaya@mail.ru

Ольга Юрьевна Словарева – кандидат биол. наук, доцент кафедры фитосанитарной биологии и безопасности экосистем ФГАУ ВО «РУДН им. Патриса Лумумбы», старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», <https://orcid.org/0000-0001-6022-5955>, SPIN-код: 4396-9436

Елена Анатольевна Калашникова – доктор биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН ИФР РАН, <https://orcid.org/0000-0002-2655-1789>, SPIN-код: 6776-2635

Рима Нориковна Киракосян – кандидат биол. наук, доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева, <https://orcid.org/0000-0002-5244-4311>, SPIN-код: 5260-8784

About the Authors:

Dana A. Domoratskaya – PhD student of the Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy; Junior Researcher of Laboratory of Bacteriology and GMO analysis of Testing Laboratory Center, All-Russian Plant Quarantine Center, <https://orcid.org/0009-0005-9362-6655>, SPIN-code: 8506-7534, Corresponding Author, danadomoratskaya@mail.ru

Olga Yu. Slovareva – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor of the Department of Phytosanitary Biology and Ecosystem Safety, RUDN University; Senior Researcher - Head of the Scientific and Methodological Department of Bacteriology, All-Russian Plant Quarantine Center, <https://orcid.org/0000-0001-6022-5955>, SPIN-code: 4396-9436

Elena A. Kalashnikova – Dr. Sci. (Biology), Professor, Lead Researcher of the K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-2655-1789>, SPIN-code: 6776-2635

Rima N. Kirakosyan – Cand. Sci. (Biology), Associate Professor of the Department of Biotechnology, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, <https://orcid.org/0000-0002-5244-4311>, SPIN-code: 5260-8784