

# Charakterystyka, wykrywanie i identyfikacja bakterii *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*

Sylwia Jafra, Ewa Łojkowska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany  
Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku  
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk  
e-mail: lojrowsk@biotech.univ.gda.pl

**Słowa kluczowe:** śluzak, *Ralstonia solanacearum*, patogeniczność, metody wykrywania i identyfikacji

## Wstęp

Bakterie *Pseudomonas solanacearum* (SMITH) SMITH powodują więdnienie naczyniowe wielu gatunków roślin i są jednymi z ich najważniejszych patogenów bakteryjnych, którym poświęcono wiele badań [18, 25]. Wywoływana przez te bakterie na roślinach ziemniaka choroba zwana śluzakiem jest najgroźniejszą chorobą tego gatunku w strefie tropikalnej i subtropikalnej, a w ostatnim okresie objawy tej choroby obserwowano także na roślinach rosnących w strefie umiarkowanej [15, 23, 28]. W wyniku badań biochemicznych, serologicznych i molekularnych, w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych, gatunek *P. solanacearum* wydzielono z rodzaju *Pseudomonas*, klasyfikując go jako osobny takson *Ralstonia solanacearum* (SMITH) YABUUCHI (wcześniej klasyfikowano go czasowo jako *Burkholderia solani* (SMITH) YABUUCHI) [45]. W niniejszej pracy będziemy posługiwać się nazwą *Ralstonia solanacearum*, nawet gdy cytowana literatura pochodzi z okresu, gdy stosowano nazwę *Pseudomonas solanacearum* lub *Burkholderia solani*.

Gatunek *R. solanacearum* obejmuje dużą grupę szczepów [8] mającą szeroki i ciągle powiększający się zasięg gospodarzy — obecnie kilkaset gatunków roślin należących do około 50 rodzin, w tym *Compositae* (złożone), *Solanaceae* (psiankowate) i *Leguminosaceae* (motylkowe) [28]. *R. solanacearum* wywołuje objawy chorobowe na wielu ważnych gospodarczo gatunkach roślin, takich jak: ziemniak, pomidor, oberżyna, orzeszek ziemny, pieprz, tytoń, banan czy oliwka [18]. *R. solanacearum* we wszystkich stadiach rozwoju rośliny może powodować żółknięcie liści, więdnienie i karłowacenie roślin, a w rezultacie ich zamieranie [25]. Charakterystycznym obja-

wem choroby jest, obserwowany po przekrojeniu łodyg, wyciek mlecznobiałego śluzu z wiązek przewodzących. Na bulwach ziemniaka obserwuje się szarobrazowe przebarwienia najczęściej zlokalizowane w sąsiedztwie oczek.

Szczepy bakterii należących do gatunku *R. solanacearum* stanowią, pod względem taksonomicznym, grupę bardzo heterogenną. Duże zróżnicowanie ma odzwierciedlenie w funkcjonowaniu dwóch systemów klasyfikacji w obrębie tego gatunku. Szczepy *R. solanacearum* podzielono, ze względu na zakres gospodarzy i morfologię kolonii bakteryjnych, początkowo na 3 [8], a następnie na 5 ras [10]. Drugi podział, uwzględniający różnice w zdolności do utleniania dwucukrów (maltozy, laktozy i celobiozy) oraz alkoholi sześciowęglowych (mannitolu, sorbitolu i dulicytolu), grupuje szczepy *R. solanacearum* w 4 biowary (biotypy) [18]. Stwierdzono, iż z wyjątkiem biowaru 3, do którego zaliczane są te same szczepy co do rasy 2, nie ma korelacji pomiędzy właściwościami fizjologicznymi, warunkującymi przynależność do biowaru i zakresem gospodarzy, decydującym o przynależności do rasy [10].

Bakteryjne zgnilizny wywoływane przez *R. solanacearum* są szeroko rozpowszechnione w regionach klimatu tropikalnego, subtropikalnego, a także w strefach ciepłych temperatur [25]. Odnotowano także występowanie infekcji powodowanych przez te bakterie na roślinach drzewiastych, mających znaczenie w sadownictwie i leśnictwie, występujących na terenie Australii oraz Azji [18]. Jednakże w ostatnich latach coraz więcej jest doniesień o ich występowaniu w regionach klimatu umiarkowanego [23]. W latach siedemdziesiątych stwierdzono obecność bakterii należących do gatunku *R. solanacearum* w Szwecji [31], a ostatnio także w innych krajach europejskich: Belgii, Francji, Hiszpanii, Holandii, Portugalii, Wielkiej Brytanii i Włoszech [15, 23]. Są dane wskazujące, iż bakterie z gatunku *R. solanacearum* dotarły do Belgii, Holandii, Szwecji i Wielkiej Brytanii wraz z zainfekowanymi bulwami ziemniaka sprowadzonymi z krajów Afryki Północnej. Mogły zostać sprowadzone na bulwach ziemniaka importowanych do Europy przede wszystkim wiosną, a w mniejszym zakresie także w okresie letnim i jesiennym i służących jako ziemniaki konsumpcyjne. W wyniku mycia zakażonych bulw i niekontrolowanego bądź też niewystarczająco kontrolowanego odprowadzania użytej wody do zbiorników naturalnych bakterie mogły rozprzestrzenić się w wodach gruntowych, a następnie kanałach i rzekach. Tak w wypadku Holandii, jak i Wielkiej Brytanii stwierdzono obecność i rozmnażanie się tych bakterii na powierzchni żywicieli pośrednich, roślin z rodziny *Solanaceae*, zasiedlających zbiorniki wodne. Jeżeli woda służąca do nawadniania plantacji ziemniaka jest pobierana ze zbiorników naturalnych, w których znajdują się bakterie z gatunku *R. solanacearum*, to stanowi ona doskonałe źródło infekcji. W Europie objawy śluzaka obserwowane były na plantacjach nawadnianych latem 1994 i 1995 roku, prawdopodobnie fakt ten związany był także ze stosunkowo wysoką średnią temperaturą w sezonie wegetacyjnym.

Znane są również opisy występowania tego patogena na obszarze Polski przed 1945 rokiem [29, 45], a także w 1961 roku [31]. Jednakże późniejsze dane nie potwier-

dzają doniesień o występowaniu tych bakterii na terenie naszego kraju, wskazując na niewłaściwą identyfikację czynnika wywołującego objawy chorobowe [23].

W wielu krajach europejskich *R. solanacearum* jest patogenem kwarantannowym podlegającym obowiązkowi zwalczania. Z tego względu wszystkie kraje należące i stowarzyszone z Unią Europejską, w obrocie sadzeniakami ziemniaka, mają obowiązek przedstawiania certyfikatów gwarantujących brak obecności tego patogena w materiale roślinnym. Również w Polsce patogen ten jest umieszczony w wykazie organizmów szkodliwych, podlegających obowiązkowi zwalczania i których przywóz do kraju jest zabroniony [5]. W celu oceny występowania *R. solanacearum* w Polsce stosuje się przyjęte w ramach dyrektyw Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (ang. European Plant Protection Organisation, EPPO) metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum*, większość z nich zostanie opisana w drugiej części niniejszego opracowania.

## Charakterystyka gatunku *R. solanacearum*

---

Bakterie *R. solanacearum* należą do Gram-ujemnych, nietworzących przetrwalników i otoczek bezwzględnych tlenowców. Komórki są zwykle urzęsione mono- lub politrichalnie [18]. W pożywce płynnej dzikie szczepy *R. solanacearum* zazwyczaj nie wytwarzają wici i nie wykazują zdolności ruchu, natomiast szczepy awirulentne wykazują w pożywkach płynnych aktywność ruchową. Optymalną temperaturą wzrostu dla większości szczepów *R. solanacearum* jest 30–32°C, chociaż bakterie te mogą rosnąć także w temperaturach niższych. Bakterie *R. solanacearum* są oksydazododatnie, wykazują zdolność redukcji azotanów i hydrolizy asparaginy, nie upłynniają albo upłynniają bardzo powoli żelatynę, nie mają zdolności rozkładu skrobi [32].

Na stałych pożywkach bakterie *R. solanacearum* wytwarzają przynajmniej dwa typy kolonii: pierwszy to kolonie gładkie, lśniące i wypukłe, drugi — to kolonie lekko szorstkie, suche i płaskie. Niektóre szczepy posiadają zdolność wytwarzania brązowego barwnika [32]. Kelman [26] wyróżnił trzy typy kolonii *R. solanacearum* rosnących na podłożu zawierającym chlorek tetrazoliowy. Szczepy dzikiego typu rosnące na tej pożywce charakteryzują się nieregularnymi, gładkimi koloniami z różowym środkiem (typ pierwszy), natomiast najczęściej występujące mutanty tworzą czerwone, regularne kolonie z niebieskawym brzegiem (typ drugi). Trzeci typ kolonii występuje znacznie rzadziej; kolonie są szorstkie i przejrzyste [26]. Bakterie tworzące różne typy kolonii różnią się także patogenicznością oraz zdolnością do wytwarzania egzopolisacharydów [7, 26].

## Rozprzestrzenianie się bakterii i warunki środowiskowe sprzyjające infekcji

---

Jako patogeny fakultatywne bakterie z gatunku *R. solanacearum* mogą przeżywać w glebie, w wodzie lub na powierzchni rośliny jako epifity lub saprofity [18]. Źródłem infekcji są najczęściej zakażone rośliny uprawne (np. sadzeniaki) lub dziko rosnące rośliny żywicielskie (np.: *Solanum dulcamara* L. — psianka słodkogórz, *Solanum nigrum* L. EM. MILL. — psianka czarna), także zakażona gleba lub woda. Rośliny — gospodarze pośredni — nie wykazują objawów chorobowych, ale bakterie rozmnażają się w ich tkankach i mogą być z nich przenoszone na inne rośliny [9]. Zwiększa to szansę bakterii na przeżycie, sprzyja rozmnażaniu się i rozprzestrzenianiu bakterii.

Infekcja rozpoczyna się od wnikięcia bakterii do systemu korzeniowego rośliny poprzez drobne zranienia tkanki, powodowane przez występujące w glebie nicienie, lub uszkodzenia mechaniczne, związane z technologią uprawy [19, 25]. Wykazano, iż zranienia nie zawsze są niezbędne do zainfekowania rośliny. Bakterie te mogą wnikać do systemu korzeniowego rośliny w miejscach tworzenia się korzeni bocznych i dalej, poprzez system naczyń przewodzących, rozprowadzane są po całej roślinie [27].

Bakterie z gatunku *R. solanacearum* mają wysoką żywotność w warunkach dużej wilgotności, a znacznie niższą, gdy wilgotność spada do 50%. W krajach klimatu umiarkowanego infekcje ziemniaka są wywoływane przede wszystkim przez szczepy *R. solanacearum* należące do rasy 3 i biowaru 2, dla której optimum temperaturowe wynosi 27°C, a choroba może się rozwijać przy średniej temperaturze dobowej 13–16°C [9]. Bakterie należące do rasy 3 przeżywają tylko kilka dni w temperaturze 40°C, natomiast stosunkowo dobrze tolerują zamrażanie i przechowywanie w –20°C [24]. Szczepy należące do rasy 3 dobrze rozmnażają się na powierzchni korzeni gospodarzy pośrednich, takich jak psianka słodkogórz i psianka czarna — chwastów z rodziny psiankowatych [16] — oraz pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica* L.) [47], powszechnie występujących w krajach europejskich. W wypadku psianki słodkogórz, rosnącej przy brzegach zbiorników wodnych, bakterie zasiedlają system korzeniowy i rozmnażają się w wodzie, która staje się rezerwuarem patogena, a zastosowana do nawadniania plantacji — źródłem infekcji [16].

Zainfekowane latentnie bulwy ziemniaka nie wykazują symptomów chorobowych do czasu wystąpienia sprzyjających rozwojowi choroby warunków środowiskowych. Ważnym czynnikiem wpływającym na interakcje roślina–patogen, a także na przeżycie *R. solanacearum* w glebie jest temperatura. Czynnikiem ten odgrywa także istotną rolę w geograficznym rozprzestrzenieniu się tego patogena, ponieważ gatunek *R. solanacearum* rzadko występuje na terenach, gdzie średnia roczna temperatura gleby jest niższa niż 15°C [25].

## Czynniki genetyczne warunkujące patogeniczność *R. solanacearum*

---

Czynniki genetyczne warunkujące patogeniczność bakterii *Ralstonia solanacearum* są od wielu lat intensywnie badane, ciągle jednak nie są one w pełni poznane. Badania biochemiczne i genetyczne wykazały, że istotne znaczenie w patogeniczności bakterii mają wytwarzane przez nie zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS) [11, 36] oraz zewnątrzkomórkowe poligalakturonazy (PGs) [3] i endoglukanazy (Egl) [35].

Rozwój procesu chorobowego wywoływanego przez *R. solanacearum* wiąże się z produkcją dużych ilości zewnątrzkomórkowych polisacharydów [7, 13, 19]. Rozmnażające się w przestrzeniach międzykomórkowych tkanek roślinnych bakterie wydzielają EPS w postaci śluzu. Śluz sprzyja agregacji komórek bakterii i powoduje zatykanie wiązek przewodzących. Rezultatem tego procesu jest zahamowanie przewodzenia wody i występowanie charakterystycznego wędnięcia rośliny [7]. Rośliny wędną nie z powodu braku wody w podłożu, ale w wyniku zatkania naczyń śluzem. Według niektórych badaczy, EPS mogą także zapobiegać lub opóźniać uruchomienie systemu obronnego rośliny [13]. Scharakteryzowano kilka zewnątrzkomórkowych polisacharydów wytwarzanych przez bakterie z gatunku *R. solanacearum*, ostatnie prace wykazują, iż najważniejszym z nich jest kwaśny polisacharyd EPS1, o dużej masie cząsteczkowej ( $10^6$  Da). Ułatwia infekcję systemu korzeniowego, odgrywając rolę w procesie „przyczepiania” (ang. attachment) bakterii i kolonizację systemu przewodzącego rośliny przez bakterie [4]. Jednak precyzyjne określenie roli kwaśnego polisacharydu EPS1 w procesie patogenezy wymaga dalszych badań.

Regulacja ekspresji genów warunkujących biosyntezę EPS, PG i Egl jest niezwykle złożona i istotna dla rozwoju procesu chorobowego w roślinie gospodarza. Żaden z wymienionych związków nie jest niezbędny do rozwoju infekcji, ale każdy z nich odgrywa istotną rolę w patogenezie [38]. Szczepy *R. solanacearum* wytwarzają endo- i egzopoligalakturonazy — ich liczba jest charakterystyczna dla poszczególnych biowarów patogena. Badania molekularne umożliwiające mutacje i „wyłączanie” genów warunkujących biosyntezę polisacharydów lub białek pozwoliły na opisanie złożonego systemu regulacji ekspresji i wydzielania na zewnątrz komórki związków determinujących patogeniczność [2]. W wyniku prowadzonych badań stwierdzono także, iż aktywność wytwarzanych przez bakterie *R. solanacearum* poligalakturonaz jest około 100-krotnie wyższa, gdy bakterie rozmnażają się w tkankach liści tytoniu, niż wtedy, gdy rosną na bogatej pożywce mikrobiologicznej. Efekt ten może wynikać z faktu, iż składniki pożywki mogą hamować aktywność PG bądź że niezidentyfikowane czynniki zawarte w tkance roślinnej mogą indukować ekspresję genów warunkujących ich biosyntezę [3]. Zapoczątkowanie produkcji EPS, PGs i Egl bezpośrednio po infekcji jest uwarunkowane liczebnością populacji bakteryjnej i jest regulowane poprzez tzw. współczynnik gęstości popula-

cji (ang. quorum sensing mechanisms). Biosynteza tych związków może być uruchamiana poprzez endogenne elicytory, np. estry metylowe kwasu palmitynowego, gromadzące się w przestrzeniach międzykomórkowych zainfekowanych roślin. Indukcja ekspresji genów warunkujących biosyntezę EPS i PGs następuje zwykle dopiero wtedy, gdy liczebność bakterii osiąga poziom  $10^7$  jtk [jednostek tworzących kolonię] w 1 g świeżej masy tkanki [3].

Jak wspomniano wcześniej, tak produkowane przez *R. solanacearum* polisacharydy, jak i poligalakturonazy muszą być wypompowane na zewnątrz komórki bakteryjnej. Stąd też niezwykle istotna rola w procesie patogenezy całego systemu genów kodujących białka wydzielnicze systemu sekrecyjnego typu III oraz całą serię białek regulatorowych tego systemu [1]. Geny kontrolujące proces sekrecji należą do grupy genów hrp (ang. hypersensitive response) i są kluczowymi czynnikami warunkującymi patogeniczność dużej części bakterii Gram-ujemnych. Geny z grupy hrp warunkują powstawanie objawów chorobowych w tkankach roślinnych, ale także indukują reakcję obronną, nazywaną reakcją nadwrażliwości, na roślinach odpornych na danego patogena. Geny hrp w pierwszym etapie interakcji komórek bakteryjnych z tkanką roślinną warunkują formowanie się na powierzchni komórek bakteryjnych podobnych do pili struktur, łączących te komórki z komórkami roślinnymi [1]. Wcześniejsze prace wykazywały, iż ekspresja genów hrp jest niska, gdy bakterie rozmnażają się na bogatej pożywce, wzrasta natomiast znacznie w wyniku interakcji roślina–patogen. Dopiero jednak prace grupy Bouchera, w których zastosowano fuzje genu hrp z genem reporterowym GFP (ang. green fluorescent protein), wykazały bezpośrednio, iż indukcja ekspresji tych genów następuje w wyniku bezpośredniego kontaktu komórek bakterii i rośliny [1]. Co więcej, grupa ta opisała pierwszy bakteryjny receptor, będący niedyfundującą cząsteczką sygnałną, która indukuje ekspresję genów kodujących białka lub inne związki warunkujące patogeniczność.

## Wykrywanie i identyfikacja bakterii należących do gatunku *Ralstonia solanacearum*

---

### Testy biochemiczne i biologiczne

Tradycyjne metody wykrywania bakteryjnych patogenów roślin polegają na posiewie badanego materiału (np. homogenatu zainfekowanej tkanki roślinnej) na odpowiednie podłoża selekcyjne, izolacji jednorodnych kultur oraz ich charakterystyce biochemicznej [41]. Zwykle identyfikacja biochemiczna potwierdzana jest testami patogeniczności, polegającymi na inokulacji roślin testowych (np. w wypadku *R. solanacearum* kilkutygodniowych roślin pomidora). Testy patogeniczności mogą być prowadzone na różnych roślinach, na tej podstawie bakterie są klasyfikowane do odpowiednich ras (patowarów) [10], a na podstawie zdolności do utleniania dwucukrów

i alkoholi 6-węglowych do biowarów [18, 19]. Metody te wymagają jednak uzyskania czystych kultur bakterii, co znacznie wydłuża czas wykrywania i identyfikacji sprawcy choroby (zwykle do 2–3 tygodni). Elphinstone i in. [16] wykazali, że zastosowanie półselektywnego podłoża SMSA (zawierającego chlorek tetrazoliowy i szereg antybiotyków) do wysiewu seryjnych rozcieńczeń ekstraktu uzyskanego z tkanki bulw ziemniaka pozwala na wykrycie komórek *R. solanacearum*, gdy ich liczba jest nie mniejsza niż  $10^4$  jtk  $\cdot$   $0,001$  dm<sup>-3</sup> ekstraktu. Ponieważ metoda ta pozwala na wykrycie żywych (infekcyjnych) komórek patogena, jest polecana do stosowania w ekspertyzach fitopatologicznych [16, 17].

Potrzeba skrócenia czasu identyfikacji patogena, zwłaszcza w wypadku organizmów kwarantannowych, oraz zagrożenie infekcją *R. solanacearum* w krajach Unii Europejskiej spowodowały wzrost zainteresowania nowoczesnymi technikami identyfikacji tego groźnego patogena [20, 39, 41, 48].

W latach osiemdziesiątych zaczęto wykorzystywać do identyfikacji *R. solanacearum* takie metody, jak analiza profilu metabolicznego [6, 41] oraz profilu kwasów tłuszczowych [22, 41]. Metody te znacznie przyspieszyły proces identyfikacji, jednak tak jak poprzednie wymagały izolacji czystych kultur patogena. Badanie profilu metabolicznego jest techniką opartą na klasycznych testach biochemicznych, ale wykorzystującą specjalnie przygotowane gotowe zestawy odczynników, które znacznie usprawniają proces identyfikacji bakterii. Zestawy typu BIOLOG czy API pozwalają na analizę profilu metabolicznego identyfikowanego szczepu na podstawie badania zdolności do wzrostu na danym podłożu (obserwacja zmętnienia podłoża) lub badania aktywności metabolicznej (zmiana pH, zmiana potencjału redoks obserwowana jako zmiana zabarwienia wskaźnika znajdującego się w podłożu).

Firma BIOLOG Inc (Hayward, California, USA) opracowała system analizujący zdolność do wykorzystywania (utleniania) przez testowane bakterie 95 różnych źródeł węgla. W systemie BIOLOG znalazły zastosowanie mikro płytki o 96 studzienkach, z których 95 zawiera różne podłoża bakteryjne, a jedna jest studzienką kontrolną. Uzyskiwany wzór aktywności metabolicznej jest charakterystyczny dla danego gatunku i podgatunku, a jego porównanie do profili zamieszczonych w komputerowej bazie danych umożliwia szybką identyfikację patogena [6, 41, 44].

Szerokie zastosowanie do identyfikacji *R. solanacearum* znalazła analiza składu jakościowego i ilościowego, czyli profilu kwasów tłuszczowych obecnych w błonach komórkowych. Bakterie w obrębie jednostek systematycznych (rodzaj, gatunek) różnią się jakościowym i ilościowym składem kwasów tłuszczowych [41]. W ekstraktach z komórek bakteryjnych scharakteryzowano ponad 300 różnych kwasów tłuszczowych i ich pochodnych. W pierwszym etapie wyizolowane kwasy tłuszczowe poddawane są estryfikacji poprzez gotowanie w metanolu z wodorotlenkiem sodu. Uzyskane estry metylowe kwasów tłuszczowych rozdzielane są za pomocą kapilarnej chromatografii gazowej [44]. Analiza uzyskanych profili kwasów tłuszczowych oraz porównanie uzyskanych wyników z komputerową bazą profili wyższych kwasów

tłuszczowych występujących w różnych taksonach umożliwia szybką identyfikację patogena. Metody analizy profili tłuszczowych stosowane są do klasyfikowania bakterii z rodzajów: *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* [44]. W Europie tego typu analizy patogenów roślin wykonuje usługowo Central Science Laboratory w York w Wielkiej Brytanii oraz Plant Protection Service w Wageningen w Holandii.

## Metody immunologiczne

Metody immunologiczne stosowane do wykrywania *R. solanacearum* opierają się na wykorzystaniu specyficznych przeciwciał poli- lub monoklonalnych skierowanych przeciwko charakterystycznym antygenom patogena. W wypadku *R. solanacearum* wyodrębniono cztery kategorie antygenów: zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), składniki strukturalne ściany komórkowej — antygen „O”, zewnątrzkomórkowe glikoproteiny oraz wici — antygen „H” [14]. Także enzymy wytwarzane przez te bakterie i odgrywające niewątpliwą rolę w rozwoju procesu chorobowego były wykorzystywane do produkcji przeciwciał. Schell [38] wykazał, iż antygeny dla oczyszczonych preparatów zewnątrzkomórkowej  $\beta$ -1,4-endoglukanazy *R. solanacearum* pozwalają na efektywną identyfikację bakterii należących do tego gatunku. Również antygeny uzyskane dla poligalakturonazy wytwarzanej przez bakterie z gatunku *R. solanacearum* znalazły zastosowanie w testach immunologicznych [3, 13]. W immunologicznej identyfikacji bakterii z gatunku *R. solanacearum* wykorzystywano różne techniki, natomiast do badań rutynowych stosuje się testy ELISA (ang. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) oraz testy immunofluorescencyjne ze znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami (ang. indirect Immuno-Fluorescence Antibody Staining, indirect IFAS) [20, 41] bądź testy, w których barwnikiem fluorescencyjnym znakuje się bezpośrednio komórki bakteryjne (ang. Immuno-Fluorescence Colony Staining, IFCS) [46].

W teście ELISA antygen wiązany jest ze specyficznym przeciwciałem sprzęgniętym z enzymem (np. alkaliczną fosfatazą, peroksydazą). W wyniku reakcji enzymu z substratem powstaje barwny produkt, intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do stężenia antygeny i może być oznaczana spektrometrycznie. W zmodyfikowanych testach ELISA (ang. indirect ELISA) stosuje się dwa rodzaje przeciwciał: pierwszorzędowe nie są znakowane enzymem, natomiast drugorzędowe znakowane enzymem lub biotyną. Testy ELISA stosowane do wykrywania *R. solanacearum* w ekstraktach roślinnych i glebie są ciągle udoskonalane w celu zwiększenia czułości testu, a także wyeliminowania niespecyficznych reakcji między stosowanymi w teście przeciwciałami a cząsteczkami gleby, tkanki roślinnej czy innymi bakteriami [20]. Jak wynika z doniesień literaturowych, czułość reakcji ELISA różni się w zależności od stosowanych w poszczególnych laboratoriach badawczych przeciwciał poli- lub monoklonalnych i waha się od  $10^3$ – $10^4$  jtk  $\cdot$  0,001 dm<sup>-3</sup> do  $6 \times 10^6$  jtk  $\cdot$  0,001 dm<sup>-3</sup> [40].



Zastosowanie metody IFAS wykorzystującej przeciwciała poliklonalne sprzężone z fluorescencyjnym znacznikiem — izotiocyaniną fluoresceiny (FITC — ang. fluorescein isothiocyanate), pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych wyników i umożliwia wykrywanie bakterii, gdy ich liczebność wynosi około  $10^4$  jtk  $\cdot$   $0,001$  dm<sup>-3</sup> [16, 20]. Jednakże zarówno w wypadku testu ELISA, jak i IFAS stosowane dotychczas przeciwciała poliklonalne wykazują tendencję do tracenia specyficzności gatunkowej i dlatego ich stosowanie często prowadzi do uzyskiwania fałszywie pozytywnych wyników [15, 20, 40]. Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych zwiększa specyficzność reakcji, ale często redukuje jej czułość w wypadku testu ELISA. Przeciwciała monoklonalne nie były dotychczas stosowane do wykrywania kolonii bakteryjnych metodą IFAS [40].

W ostatnich latach wykazano, iż czułość testów opartych na reakcjach immunologicznych można znacznie podwyższyć, jeżeli w pierwszym etapie wykrywania patogena stosuje się tzw. wzbogacenie populacji (ang. enrichment), prowadzące do rozmnożenia się patogena. Elphinstone i in. [16] wykazał przydatność do tego celu zmodyfikowanego podłoża SMSA. Posiew badanej próby na to podłoże hamuje wzrost części bakterii saprofitycznych występujących w badanej próbce i umożliwia intensywniejsze rozmnażanie się bakterii z gatunku *R. solanacearum*.

## Metody molekularne

Do identyfikacji bakterii *R. solanacearum* próbowano stosować różne metody oparte na identyfikacji specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych. Pierwsze testy oparte były na sondach oligonukleotydowych (sondy molekularne), zawierających DNA o specyficznej sekwencji i znakowane izotopowo lub fluorescencyjnie. W wypadku obecności w badanej próbce patogena, w wyniku kontaktu sondy z wyizolowanym z tej próby DNA genomowym, następuje hybrydyzacja DNA ze znakowaną sondą. Duże trudności stwarza jednak w tym wypadku fakt, iż gatunek *R. solanacearum* wykazuje duże zróżnicowanie genetyczne [10] (sonda molekularna powinna pozwalać na wykrywanie całego spektrum patogena), a z drugiej strony DNA niektórych szczepów tego gatunku wykazuje znaczną homologię do DNA *Pseudomonas syzygii* (*Ralstonia syzygii*), co może prowadzić do uzyskiwania fałszywie pozytywnych wyników. Opisana przez Seal i in. [43] sonda molekularna PS2096 pozwalała na szybkie wykrycie i identyfikację bakterii w średnio porażonym materiale roślinnym, ale nie umożliwiała wykrywania infekcji latentnych, czyli miała ograniczoną przydatność w badaniach organizmów kwarantannowych. Wykrywanie latentnych infekcji *R. solanacearum* umożliwia zastosowanie sond molekularnych zawierających fragmenty DNA komplementarnego do sekwencji DNA kodującej 16S rybosomalny RNA [12, 43].

W ostatniej dekadzie szczególną rolę w badaniach epidemiologicznych odgrywa metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) i jej

modyfikacje. Również w fitopatologii do identyfikacji patogenów bakteryjnych, wirusowych, wiroidowych i grzybowych wykorzystuje się testy PCR polegające na identyfikacji sekwencji DNA charakterystycznych dla danego czynnika chorobotwórczego (np. geny determinujące patogeniczność). Reakcja PCR opiera się na zastosowaniu dwóch starterów (oligonukleotyd DNA), komplementarnych do regionów flankujących fragment genomowego DNA bakteryjnego, który ma sekwencję specyficzną i charakterystyczną dla danego gatunku. Kopie tego fragmentu są następnie syntetyzowane *in vitro*, w wyniku powtarzających się cykli polegających na termicznej denaturacji dwuniciowego DNA, przyłączaniu starterów do sekwencji komplementarnych i do budowywaniu komplementarnego łańcucha DNA przez termostabilną polimerazę DNA. W wyniku tego procesu, w czasie około dwóch godzin, można uzyskać znaczne ilości DNA o określonej sekwencji i długości, które następnie mogą być identyfikowane metodą elektroforezy w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. PCR umożliwia wykrywanie nawet pojedynczych komórek patogena, ponieważ w trakcie amplifikacji dochodzi do powstania milionów kopii matrycowego DNA.

Startery (PS96-H i PS96-I) do identyfikacji *R. solanacearum* za pomocą reakcji PCR zostały opracowane na bazie sekwencji sondy molekularnej PS2096 [42] i pozwalają na amplifikację specyficznego dla tego gatunku fragmentu DNA zawierającego 148 par zasad. Startery te pozwalają na wykrycie *R. solanacearum*, gdy w 1 gramie zainfekowanej tkanki roślinnej lub gleby znajduje się około 100 komórek tych bakterii.

Sekwencje genów kodujących 16S rRNA są specyficzne dla gatunku i stąd wykorzystuje się je w badaniach filogenetycznych. Na podstawie sekwencji 16S rDNA *R. solanacearum* i innych blisko spokrewnionych gatunków zostały skonstruowane trzy różne startery do testu PCR [43]. Natomiast do identyfikacji szczepów należących do gatunku *R. solanacearum* wykorzystano dwa z nich: OLI-1 i Y-2, które w teście PCR dają produkt wielkości około 288 par zasad, specyficzny dla tego gatunku [39, 43]. Obecnie testy PCR z wykorzystaniem powyższych starterów znajdują zastosowanie w rutynowych badaniach dotyczących wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* w wielu laboratoriach badawczych i diagnostycznych w Europie [39]. W wypadku tych testów czułość reakcji PCR waha się od  $10^2$ – $10^3$  jtk · 0,001 dm<sup>-3</sup> do  $6 \times 10^6$  jtk · 0,001 dm<sup>-3</sup> w zależności od laboratorium [40]. Na specyficzność i czułość reakcji PCR w próbach zainfekowanej tkanki roślinnej lub gleby mogą mieć wpływ czynniki znajdujące się w tkance roślinnej lub glebie i hamujące aktywność polimerazy DNA [41].

Większą czułość reakcji PCR można uzyskać poprzez zastosowanie w pierwszym etapie podłoża selektywnego SMSA do „wzbogacenia” populacji *R. solanacearum* tzw. enrichment-PCR [16] lub Bio-PCR [37]. Preinkubacja prób z selektywną pożywką pozwoliła na około czterokrotne podwyższenie czułości stosowanych testów PCR [16].

Elphinstone i in. [16] wykazali, iż zwiększenie czułości testu opartego na reakcji PCR można uzyskać także poprzez zastosowanie dwóch kolejnych reakcji PCR, tzw.

nested-PCR. W pierwszej reakcji stosuje się startery o szerokiej specyficzności, a w drugiej charakterystyczne dla ściśle określonego gatunku mikroorganizmów.

Ze względu na wrażliwość polimerazy stosowanej w testach PCR na czynniki hamujące, znajdujące się w tkance roślinnej czy glebie, istnieje konieczność stosowania tzw. kontroli wewnętrznej (ang. internal control, internal standard) dodawanych do badanych za pomocą testu PCR prób [40]. Kontrola wewnętrzna to zwykle fragment DNA, wykazujący homologię do stosowanych starterów i wprowadzony do badanej próby w formie wolnego DNA bądź plazmidu, bądź dodany do próby w komórkach innych bakterii blisko spokrewnionych z *R. solanacearum* (np. *Burkholderia pikettii*). W tym ostatnim wypadku w procedurze poprzedzającej test PCR fragment ten musi być wprowadzony do komórek *Burkholderia pikettii* i zrekombinowany z ich genomem.

Wprowadzony w ten sposób standard wewnętrzny w wyniku amplifikacji daje produkt DNA o innej (większej lub mniejszej) wielkości oraz odmiennej sekwencji niż produkt specyficzny dla *R. solanacearum* [Van der Wolf, informacja ustna]. W wypadku obecności w tkance roślinnej komórek patogena i braku inhibitorów polimerazy uzyskuje się dwa produkty reakcji PCR o różnej wielkości. Jeden z nich jest specyficzny dla patogena, drugi to produkt amplifikacji standardu wewnętrznego. Jeżeli w badanej tkance nie ma komórek patogena uzyskuje się jeden produkt, o wielkości charakterystycznej dla standardu wewnętrznego. Brak produktów reakcji PCR wskazuje na hamowanie polimerazy przez składniki tkanki roślinnej, niewłaściwy skład mieszaniny reakcyjnej bądź niewłaściwe warunki amplifikacji (np. brak lizy komórek bakteryjnych, źle dobrana temperatura reakcji).

Wullings i in. [48] zaproponowali zastosowanie do wykrywania *R. solanacearum* metody opartej na fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (ang. Fluorescent in situ Hybridisation, FISH). Na podstawie sekwencji DNA kodującej 23S rRNA opracowano dwie specyficzne dla *R. solanacearum*, *R. syzygii* i BDB (ang. blood disease bacterium) sondy RSOLA i RSOLB [48]. Uzyskane sondy wykazują specyficzność względem RNA izolowanego ze szczepów *R. solanacearum*. Stwierdzono, że w wypadku zastosowania sondy RSOLA do wykrywania komórek *R. solanacearum* uzyskano słabszy sygnał hybrydyzacji niż przy stosowaniu sondy RSOLB, dlatego też do analiz FISH wybrano sondę RSOLB. W celu potwierdzenia pełnej specyficzności metody FISH niezbędne są dalsze badania z wykorzystaniem prób polowych. Wullings i in. [48] rekomendują FISH jako szybką metodę wykrywania *R. solanacearum*, uzupełniającą bądź potwierdzającą wyniki uzyskane za pomocą IFAS lub PCR.

Zgodnie z wymogami EPPO [5, 30], pozytywne wyniki uzyskane za pomocą metod serologicznych wymagają potwierdzenia przez wysiew badanego materiału (ekstraktu roślinnego) na podłoże selekcyjne SMSA [16, 17]. Następnie typowe kolonie uzyskane na tym podłożu są izolowane i ponownie identyfikowane za pomocą analizy profilu kwasów tłuszczowych, mikroskopii IIF (ang. indirect immuno-fluorescence)

oraz testu patogeniczności na roślinach pomidora [48]. Testy PCR wykonuje się alternatywnie do mikroskopii IIF oraz jako testy potwierdzające [40].

Powyższe doniesienia literaturowe wskazują na ciągłą konieczność opracowania coraz lepszych i efektywniejszych protokołów do wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum*, zarówno w ekstraktach roślinnych, jak i próbach gleby i wody. Nie mniej istotne jest także przygotowanie odpowiednich kontroli negatywnych i pozytywnych, które mogłyby być stosowane w testach ELISA i PCR [40].

## **Zastosowanie technik molekularnych do badania różnicowania genetycznego w obrębie bakterii należących do gatunku *R. solanacearum***

---

Jak już wspomniano wcześniej, zastosowanie metod biochemicznych i serologicznych pozwoliło na wyróżnienie biowarów, serotypów w obrębie opisywanego gatunku. W toku badań stwierdzono, iż w wypadku roślin uprawianych w strefie umiarkowanej największe znaczenie ma rasa 3. Zastosowanie techniki polegającej na analizie długości fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) pozwoliło na wyróżnienie 33 głównych profili RFLP charakterystycznych dla bakterii *R. solanacearum* [11]. Metoda ta polega na izolacji genomowego DNA z czystych kultur bakteryjnych, następnie trawieniu DNA przez enzymy restrykcyjne. Różnicowanie elektroforetycznego obrazu fragmentów DNA, uzyskanych w rezultacie działania enzymów restrykcyjnych, wynika z różnic w sekwencji nukleotydów w DNA, czyli z obecności lub braku miejsc restrykcyjnych dla określonych enzymów.

W wypadku poddania analizie restrykcyjnej całego genomu bakteryjnego uzyskuje się po elektroforezie bardzo złożony obraz. W metodzie opisanej przez Cook i in. [11] produkty RFLP rozdzielono w żelu poliakrylamidowym, poddano denaturacji in situ i „przeniesiono” na filtr nitrocelulozowy. Związany z nitrocelulozą DNA hybrydyzowano ze znakowaną radioaktywnie sondą. W efekcie uzyskano dla kilkuset przebadanych szczepów 33 charakterystyczne profile restrykcyjne. Metoda ta może być zastosowana z powodzeniem do badań epidemiologicznych, mających na celu np. zbadanie przemieszczania się określonych szczepów z różnych obszarów geograficznych.

Powyższa metoda jest jednak bardzo praco- i czasochłonna, dlatego obecnie do badania różnicowania populacji bakterii, w tym także *R. solanacearum*, wykorzystuje się technikę PCR-RFLP, w której w pierwszym etapie powiela się określony fragment genomu w reakcji amplifikacji, a następnie już tylko amplifikowany fragment DNA poddaje się analizie restrykcyjnej [33]. W tym wypadku różne profile PCR-RFLP identyfikuje się bezpośrednio na żelu poliakrylamidowym.

Inną metodą pozwalającą na efektywne badanie zróżnicowania w obrębie gatunku *R. solanacearum* jest selektywna amplifikacja fragmentów restrykcyjnych (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) [34]. Metoda AFLP wymaga bardzo małej ilości wyjściowego DNA i polega na badaniu obecności lub braku amplifikacji specyficznych fragmentów restrykcyjnych, podczas gdy w metodzie RFLP badamy długość specyficznych fragmentów restrykcyjnych.

## Porównanie różnych technik wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum*

---

Wykrywanie i identyfikacja bakterii za pomocą metod immunologicznych i molekularnych nie wymaga hodowli bakterii i pozwala na postawienie diagnozy znacznie szybciej niż konwencjonalne metody wykrywania patogenów oparte na ich hodowli na szeregu podłoży mikrobiologicznych. Techniki molekularne oferują wysoką specyficzność i czułość, ale w porównaniu z metodami serologicznymi są znacznie droższe i trudniejsze do wykonywania w skali masowej.

Testy ELISA, IFAS są rutynowo stosowane do wykrywania patogenów roślin w celu określania zdrowotności materiału nasiennego i rozmnożeniowego w powiązaniu z kontrolą występowania organizmów kwarantannowych i certyfikacji materiału siewnego. W chwili obecnej przewaga w stosowaniu metod immunologicznych wynika z faktu, iż techniki te są bardzo dobrze opracowane i wiele laboratoriów posiada kadrę i sprzęt niezbędny do ich wykonywania.

Testy wykorzystujące specyficzne sondy molekularne mają tę przewagę, iż pozwalają na identyfikację bakterii niezależnie od stadium rozwoju patogena czy też warunków jego wzrostu i rozmnażania. W wypadku testów immunologicznych fałszywie negatywne wyniki mogą być rezultatem braku obecności specyficznej determinanty antygenowej na powierzchni komórek bakterii rosnących w niekorzystnych warunkach. Genom bakterii jest stabilny, podlega bardzo wolnym zmianom, natomiast determinanty antygenowe mogą ulegać modyfikacjom pod wpływem czynników środowiskowych.

Szybki rozwój licznych modyfikacji metod molekularnych powinien spowodować, iż także w procedurze identyfikacji organizmów kwarantannowych coraz częściej posługiwać się będziemy tego typu technikami. Poznanie zróżnicowania bakterii należących do tego samego gatunku powinno doprowadzić do opracowania specyficznych, a jednocześnie uniwersalnych dla tego gatunku markerów molekularnych. Istotne obniżenie pracochłonności i czasochłonności testów opartych na reakcji PCR można osiągnąć poprzez eliminację etapu elektroforezy i spektrofotometryczne lub fluorometryczne oznaczanie produktów PCR.

Przykłady takich technik są już znane i rozwijane. Testy PCR prowadzi się w mikropłytkach analogicznych do używanych w teście ELISA. Na dnie studzienek unieruchamia się sondę oligonukleotydową, specyficzną dla danego gatunku patogena. Do studzienek wprowadza się badaną próbę i mieszaninę amplifikacyjną i przeprowadza reakcję PCR. Jeden „koniec” produktu reakcji PCR hybrydyzuje z unieruchomioną na dnie studzienki sondą, a drugi hybrydyzuje z dodawaną do mieszaniny w następnym etapie sondą znakowaną peroksydazą. Po dodaniu do studzienek substratu dla peroksydazy zmiana barwy mieszaniny reakcyjnej świadczy o obecności w badanej próbce komórek patogena. Wynik testu wykonanego jednocześnie dla wielu prób może być odczytywany w automatycznych czytnikach do testu ELISA.

Inną strategię wykorzystuje się w systemie TaqMan PCR, który także pozwala na odczytanie wyniku testu PCR bez potrzeby wykonywania elektroforezy. Zasada tego systemu polega na wykrywaniu obecności znakowanej sondy, a nie produktu reakcji PCR. Sondy znakowane są dwoma barwnikami; pierwszy, zwykle fluorescencyjny, pełni funkcję „sygnalizatora” (ang. reporter), drugi „wyciszacza” (ang. quencher). W mieszaninie reakcyjnej znajduje się DNA matrycowe, hybrydyzowane ze znakowaną sondą; startery do reakcji PCR i polimeraza DNA, mająca równocześnie właściwości nukleazy. W wypadku hybrydyzacji starterów z DNA matrycowym następuje dobudowywanie łańcucha komplementarnego do matrycy i równocześnie degradacja znakowanej sondy. W efekcie degradacji sondy następuje odłączenie „sygnalizatora” od „wyciszacza”. Obecność i stężenie „sygnalizatora” rejestrowane są za pomocą fluorometru.

W ostatnim dziesięcioleciu możemy mówić o bardzo szybkim rozwoju technik molekularnych i ich adaptacji na potrzeby diagnostyki groźnych chorób. Oczywiście większość z nich opracowana jest z myślą o diagnostyce chorób człowieka i zwierząt i jest coraz szerzej wykorzystywana w medycynie i weterynarii. Te same techniki mogą znaleźć zastosowanie w wypadku epidemiologii chorób roślin, ale sytuacja jest o tyle złożona, iż zwykle populacja osobników, które należy przetestować, jest bardzo duża, np. reprezentatywna grupa roślin z wielohektarowej plantacji nasiennej, a co za tym idzie koszty badań są bardzo wysokie. Niezależnie od opisanych powyżej zalet metod molekularnych, można mieć wątpliwości, kiedy oparte na skomplikowanych i drogich technologiach metody wykrywania i identyfikacji *R. solanacearum* będą stosowane na skalę masową. Na pewno szybciej nastąpi to w krajach Ameryki Północnej i Europy, a znacznie później w krajach strefy tropikalnej, gdzie zagrożenie chorobami wywoływanymi przez *R. solanacearum* jest dużo większe, natomiast koszty prowadzenia badań diagnostycznych i epidemiologicznych muszą być racjonalnie niskie.

## Literatura

- [1] Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* 19: 2304–2314.
- [2] Allen C., Gay J., Simon-Buela L. 1997. A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence factors in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 1054–1064.
- [3] Allen C., Huang Y., Sequeira L. 1991. Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 147–154.
- [4] Araud-Razou I., Vasse J., Montrozier H., Etchebear C., Trigalet A. 1998. Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *Eur. J. Plant Pathol.* 194: 795–809.
- [5] Bagińska H., Kordyla-Bronka M. 1998. *Pseudomonas solanacearum* E.F. SMITH (syn. *Ralstonia solanacearum* (SMITH) YABUCHI ET AL.) — potencjalnym zagrożeniem dla upraw w Polsce. *Progress in Plant Protection Post. w Ochronie Roślin* 38: 480–483.
- [6] Black R., Sweetmore A. 1993. Identification and characterisation of *Pseudomonas solanacearum* using metabolic profiles. W: Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference. Koahsiung, Taiwan. Red.: G.L. Hartman, A.C. Hayward. ACIAR Proceedings, Canberra, Australia. 32–44.
- [7] Buddenhagen I., Kelman A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 203–230.
- [8] Buddenhagen I. W., Sequeira L., Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726.
- [9] Ciampi L., Sequeira L. 1980. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. *Am. Potato J.* 57: 319–329.
- [10] Cook D., Barlown E., Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 113–121.
- [11] Cook D., Barlow E., Sequeira L. 1991. DNA probes as tools of the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. W: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction. Red.: H. Henneke, D.P.S. Verma. Kulver Academic Publisher. Dordrecht, Germany: 103–108.
- [12] DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. 1989. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* 243: 1360–1363.
- [13] Denny T.P. 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33: 173–197.
- [14] Digat B., Cambra M. 1976. Specificity of antigens in *Pseudomonas solanacearum* E.F. SMITH. W: Proceedings of the First International Planning Conference on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Disease Caused by *Pseudomonas solanacearum*. Red.: Sequeira L., Kelman A. North Carolina State University, Raleigh, USA: 38–57.
- [15] Elphinstone J.G. 1996. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (SMITH) SMITH in cool climates. *Potato Res.* 39: 403–410.

- [16] Elphinstone J.G., Hennessey J.K., Wilson J.K., Stead D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (SMITH) SMITH in potato tuber extracts. *EPPO Bull.* 26: 663–678.
- [17] Engelbrecht M.C. 1994. Modification of a selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* 10: 3–5.
- [18] Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 65–87.
- [19] Hayward A.C. 1995. *Pseudomonas solanacearum*. W: Pathogenesis and host specificity in plant diseases — histopathological, biochemical and molecular bases. Vol. 1, Prokaryotes. Red.: U.S. Singh, R.P. Singh. K. Kohmoto. Pergamon Press, United Kingdom: 139–151.
- [20] Janse J.D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bull.* 18: 343–351.
- [21] Janse J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 335–345.
- [22] Janse J.D. 1996. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. W: Diagnosis and Identification of Plant Pathogens. Red.: H.-W. Dehne i in. Kulver Academic Publisher. Bonn, Germany: 63–70.
- [23] Janse J.D. 1996. Potato brown rot in western Europe — history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *EPPO Bull.* 26: 679–695.
- [24] Janse J.D., Van Vaerebergh J. 1987. Interpretation of the EC method for the detection of latent *Corynebacterium sepedonicum* infections in potato. *EPPO Bull.* 17: 1–10.
- [25] Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* 99: 194.
- [26] Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693–695.
- [27] Kelman A., Sequeira L. 1965. Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 55: 304–309.
- [28] Kelman A., Hartman G.L., Hayward A.C. 1994. Introduction. W: Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Red.: A.C. Hayward, G.L. Hartman. CAB International, Willingford, United Kingdom: 1–7.
- [29] Miczyńska Z., Stachyra T. 1961. Choroby i szkodniki roślin psiankowatych obserwowane w latach 1951–1960. *Biul. Inst. Ochr. Roślin, Poznań.* 13: 45–79.
- [30] OEPP/EPPO. 1990. Quarantine Procedure No. 26, *Pseudomonas solanacearum*; inspection and test methods. *EPPO Bull.* 20: 255–262.
- [31] Olsson K. 1976. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (SMITH) SMITH in Sweden. *EPPO Bull.* 6: 199–127.
- [32] Palleroni N.J. 1984. Family 1. *Pseudomonadaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Red.: N.R. Krieg, J.G. Holt. Williams & Willins: 174–178.
- [33] Poussier S., Vanderwalle P., Luisetti J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2184–2194.



- [34] Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16s rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146: 1679–1692.
- [35] Roberts D.P., Denny T.P., Schell M.A. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 1445–1451.
- [36] Saile E., McGarvey J. A., Schell M. A., Denny T.P. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root inversion and colonisation of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*. 87: 1264–1271.
- [37] Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki E., Hatziloukas E., Panopoulos N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85: 243–248.
- [38] Schell M.A. 1996. To be or not to be: how *Pseudomonas solanacearum* decides whether or not to express virulence genes. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 459–469.
- [39] Seal S.E. 1995. PCR-based detection and characterization of *Pseudomonas solanacearum* for use in less developed countries. *EPPO Bull.* 25: 227–231.
- [40] Seal S.E. 1997. Diagnosis. Molecular methods for detection and discrimination of *Ralstonia solanacearum*. W: Bacterial Wilt Disease. Molecular and Ecological Aspects. Red.: Ph. Prior, C. Allen, J. Elphinstone. INRA Edition, Springer: 101–109.
- [41] Seal S.E., Elphinstone J.G. 1994. Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. W: Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Red.: A.C. Hayward, G.L. Hartman, CAB International, Willingford, United Kingdom: 35–57.
- [42] Seal S.E., Jackson L.A., Daniels M.J. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 4263–4268.
- [43] Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P.W., Daniels M.J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the 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.
- [44] Stead D.E. 1995. Profiling techniques for the identification and classification of plant pathogenic bacteria. *EPPO Bull.* 25: 143–150.
- [45] Stead D.E., Elphinstone J.G., Pambaerton A.W. 1996. Potato brown rot in Europe. Brighton Crop Protection Conference — Pests and Diseases 1996: 1145–1152.
- [46] Van Vuurde J.W.L. 1987. New approach in detecting phytopathogenic bacteria by immunisolation and immunoidentification assays. *EPPO Bull.* 17: 139–148.
- [47] Wenneker M., Verdel M.S.W., Groneneveld R.M.W., Kempenaar C., Beuningen A.R., Janse J.D. 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 307–315.
- [48] Wullings B.A., Van Beuningen A.R., Janse J.D., Akkermans D.L. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4546–4554.

## Characteristics, detection and identification of the *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* bacteria

---

**Key words:** brown rot, *Ralstonia solanacearum*, pathogenicity, detection and identification methods

### Summary

The *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* bacteria cause the disease symptoms on potato, tomato, aubergine, banana and many other hosts. Since 1992 an increased number of outbreaks of potato brown rot, caused by the race 3, biovar 2 of these bacteria were reported in several EPPO member countries, including Belgium, France, The Netherlands and the United Kingdom. The „low-temperature” race 3 of *Ralstonia solanacearum* L. was found in the most infested countries in surface water and in *Solanum dulcamara*, the weed growing along the waterways. The origins of this disease in western Europe may include the introduction through import of infected early ware or industrial potatoes from some countries of Mediterranean area. The prevention and control strategies for this dangerous bacterial pathogen are possible only through the application of early and sure detection and identification methods. Biochemical, serological and molecular methods suitable for the diagnosis of the pathogen are described.