

Использование ПЦР-систем для диагностики возбудителей бактериоза черная ножка картофеля

А.И. УСКОВ¹, И.В. ШМЫГЛЯ²,
А.А. СТАХЕЕВ³, С.К. ЗАВРИЕВ⁴, Ю.А. ВАРИЦЕВ⁵,
П.А. ГАЛУШКА⁶, Н.В. СУСЛОВА⁷

^{1, 2, 5, 6, 7} ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково,
г/о Люберцы, Московская область, Россия

^{3, 4} ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1596-8359, e-mail: korenevo2000@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4727-7141, e-mail: i.shmyglya@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-0732-5321, e-mail: stakheev.aa@gmail.com

⁴ ORCID 0000-0002-6741-8175, e-mail: szavriev@ibch.ru

⁵ ORCID 0000-0002-2329-7965, e-mail: varyuriy@yandex.ru

⁶ ORCID 0000-0003-4680-9684,
e-mail: pavel_galushka@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-9864-9945, e-mail: susli4ik@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Черная ножка картофеля – повсеместно распространенный в Российской Федерации бактериоз, вызываемый пектолитическими бактериями рода *Pectobacterium* из семейства Enterobacteriaceae. В 2009 г. на территории России были идентифицированы возбудители черной ножки картофеля, относящиеся к роду *Dickeya*: *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani*. Ежегодный недобор урожая из-за данной болезни может составлять от 1–2 до 50–70%. Основной путь распространения патогенных бактерий связан с перемещением семенного материала. Для выявления и идентификации фитопатогенов, вызывающих черную ножку картофеля, необходима разработка и оптимизация для практического использования высокочувствительных лабораторных методов. В 2019 г. в рамках Федеральной научно-технической программы (ФНТП) развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. Институтом биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Федеральным исследовательским центром картофеля имени А.Г. Лорха (ФИЦ картофеля) были разработаны новые тест-системы в формате полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для диагностики бактерий, вызывающих черную ножку картофеля, с аналитической чувствительностью выявления ДНК патогенов на уровне 10–50 копий плазмиды, содержащей специфический ПЦР-продукт, на реакцию. В статье представлены результаты сравнительных испытаний новых тест-систем для диагностики бактерий *Pectobacterium*

Using PCR Systems for the Diagnosis of Potato Blackleg Agents

A.I. USKOV¹, I.V. SHMYGLYA²,
A.A. STAKHEEV³, S.K. ZAVRIYEV⁴, Y.A. VARITSEV⁵,
P.A. GALUSHKA⁶, N.V. SUSLOVA⁷

^{1, 2, 5, 6, 7} A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research
Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia

^{3, 4} RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry,
Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1596-8359, e-mail: korenevo2000@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4727-7141, e-mail: i.shmyglya@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-0732-5321, e-mail: stakheev.aa@gmail.com

⁴ ORCID 0000-0002-6741-8175, e-mail: szavriev@ibch.ru

⁵ ORCID 0000-0002-2329-7965, e-mail: varyuriy@yandex.ru

⁶ ORCID 0000-0003-4680-9684,
e-mail: pavel_galushka@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-9864-9945, e-mail: susli4ik@yandex.ru

ABSTRACT

Blackleg of potato is a bacteriosis widespread in the Russian Federation caused by pectolytic bacteria of the genus *Pectobacterium*, Enterobacteriaceae family. In 2009, *Dickeya* spp. agents of potato blackleg were identified in Russia: *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani*. The annual yield shortfall due to this disease can reach from 1–2 to 50–70%. The main pathway for the pathogen bacteria is connected to seed material movement. The detection and identification of plant pathogens causing potato blackleg require the design and optimization of highly sensitive laboratory methods for practical use. In 2019, within the framework of the Federal Scientific and Technical Program (FSTP) of agriculture development for 2017–2025, the RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center designed new test systems in real-time PCR (RT-PCR) for the diagnosis of bacteria causing potato blackleg, with analytical sensitivity for detecting the pathogen DNA at the level of 10–50 copies of plasmids, containing a specific PCR product, per reaction. The article presents the results of comparative testing of the new test systems for the diagnosis of the bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani*. When testing 20 varieties of seed potatoes delivered to the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato

atrosepticum, *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani*. При тестировании 20 сортообразцов семенного картофеля, поступивших в Испытательную лабораторию ФИЦ картофеля от производителей из 4 регионов Российской Федерации, в 15 случаях показано полное совпадение результатов анализа при использовании рутинных и новых испытываемых тест-систем.

Ключевые слова. Черная ножка картофеля, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), диагностика, тест-система.

Благодарность. Статья подготовлена в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

Для корреспонденции. Усков Александр Ири-нархович, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, 140051, Россия, Московская область, г/о Люберцы, п. Красково, ул. Лорха, 23, литера В, e-mail: korenevo2000@mail.ru.



ВВЕДЕНИЕ

Черная ножка картофеля – широко распространенный в Российской Федерации бактериоз, вызываемый пектолитическими бактериями рода *Pectobacterium* из семейства Enterobacteriaceae. Болезнь поражает картофель как во время вегетации, так и при хранении клубней [1].

Вредоносность черной ножки проявляется в изреживании посадок картофеля, снижении продуктивности растений, ухудшении семенных и товарных качеств, развитии мокрых гнилей клубней в период хранения. Недобор урожая из-за данной болезни в России составляет от 1–2 до 50–70% [2].

В 2009 г. на территории России были идентифицированы возбудители черной ножки картофеля, относящиеся к роду *Dickeya*: *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani* [3, 4]. В настоящее время патогены рода *Dickeya* обнаружены во многих регионах РФ [5]. Симптомы проявления болезни на растениях и клубнях картофеля, вызываемой бактериями рода *Dickeya*, аналогичны симптомам, вызываемым бактериями рода *Pectobacterium*. В то же время виды *Dickeya* spp. более агрессивны и могут вызывать водянистую гниль стеблей и более активную форму мокрой гнили клубней по сравнению с *Pectobacterium atrosepticum* [6]. Для видов рода *Dickeya* характерно распространение в регионах с жарким климатом. Однако в последнее время отмечено интенсивное продвижение *Dickeya* spp. в регионы с умеренным климатом, благоприятные для производства картофеля [7, 8].

Основной путь распространения патогенных бактерий, вызывающих бактериоз черная ножка картофеля, связан с перемещением семенного материала [9, 10]. При этом нередко инфекция может находиться в скрытом (латентном) состоянии, не вызывая внешних признаков проявления болезни [11, 12]. В соответствии с действующим в настоящее время Межгосударственным стандартом

Federal Research Center by manufacturers from 4 regions of the Russian Federation, in 15 cases, complete coincidence of the analysis results was shown when using routine and new test systems.

Key words. Blackleg of potato, real-time PCR (RT-PCR), diagnosis, test system.

Acknowledgement. The article has been written within the FSTP of agriculture development for 2017–2025 (subprogram “Development of potato and seed production in the Russian Federation”).

For correspondence. Aleksandr Uskov, Doctor of Agriculture, Leading Researcher and Head of Department, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, 140051, Russia, Moscow region, Lyubertsy, Kraskovo, Lorkha str. 23-B, e-mail: korenevo2000@mail.ru.

INTRODUCTION

Blackleg of potato is a bacteriosis widespread in the Russian Federation caused by pectolytic bacteria of the genus *Pectobacterium*, Enterobacteriaceae family. The disease affects potatoes both during the growing season and tubers storage [1].

The damage caused by potato blackleg is manifested in the thinning of potato plantings, a decrease in plant productivity, reducing seed and commercial qualities and the development of soft rot of tubers during storage. The annual yield shortfall due to this disease can reach from 1–2 to 50–70% [2].

In 2009, *Dickeya* spp. agents of potato blackleg were identified in Russia: *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* [3, 4]. At present, *Dickeya* spp. pathogens have been detected in many Russian regions [5]. The disease symptoms on potato plants and tubers caused by *Dickeya* genus bacteria are similar to those brought about by *Pectobacterium* genus bacteria. At the same time, *Dickeya* spp. are more aggressive and can lead to stem soft rot and a more active form of tubers soft rot compared to *Pectobacterium atrosepticum* [6]. *Dickeya* spp. usually spread in regions with hot climate. However, *Dickeya* spp. have been recently noted to actively spread into regions with temperate climate, favourable for potato production [7, 8].

The main pathway for the pathogen bacteria causing potato blackleg is connected to seed material movement [9, 10]. It should be noted that the infection can often be in a latent state without causing external signs of the disease manifestation [11, 12]. According to the current interstate standard GOST 33996-2016 “Seed potatoes. Technical conditions and methods of determining the quality”, the presence of bacteriosis agents including potato blackleg in the initial material as well as super-super elite (or ‘S’ for EU) is not allowed [13].

ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества» наличие в исходном материале, а также в супер-суперэлите возбудителей бактериозов, в том числе черной ножки картофеля, не допускается [13].

Для выявления фитопатогенов, вызывающих черную ножку картофеля, необходима разработка и оптимизация для практического использования высокочувствительных лабораторных методов. Данные методы должны позволять эффективно контролировать возбудителей бактериоза на ранних и последующих стадиях семеноводства, обеспечивая производство высококачественного семенного материала.

Применение иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографических тест-систем в схемах контроля качества семенного картофеля позволяет эффективно выявлять зараженность тестируемого материала скрытой формой наиболее вредоносных бактериальных заболеваний [14, 15, 16, 17]. Вместе с тем у возбудителей бактериозов картофеля *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. наблюдаются большие штаммовые различия в составе поверхностных клеточных антигенов, что затрудняет их идентификацию и количественное определение иммунологическими методами [18].

Полногеномное секвенирование ДНК изолятов бактериальных патогенов, вызывающих черную ножку картофеля, открыло новые возможности для молекулярной диагностики возбудителей болезни [19, 20]. Использование высокочувствительного метода ПЦР помимо выявления минимальных количеств патогенов позволяет проводить видовую идентификацию бактерий [21]. Так, с использованием специфических праймеров было показано широкое распространение вида *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* на посадках картофеля в России осенью 2017 г. [22].

В 2019 г. в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. Институтом биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Федеральным исследовательским центром картофеля имени А.Г. Лорха были разработаны новые тест-системы в формате ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для диагностики бактерий *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani*, вызывающих черную ножку картофеля. Подробное описание параметров и характеристик разработанных систем приведено в работе Стахеева и др., 2020 [23]. Разработанные тест-системы при испытаниях показали высокую специфичность и аналитическую чувствительность выявления ДНК патогенов на уровне 10–50 копий плазмиды, содержащей специфический ПЦР-продукт, на реакцию [23].

Для дальнейшей адаптации разработанных тест-систем в практической работе диагностических лабораторий необходимо проведение их апробации в производственных условиях на материале разных категорий и классов, выращенном в различных регионах Российской Федерации. В этой связи целью настоящей работы является изучение возможности применения новых ПЦР-РВ-систем для идентификации возбудителей черной ножки картофеля при тестировании семенного материала, поступающего в аккредитованные испытательные лаборатории для контроля качества

The detection of plant pathogens causing potato blackleg requires the design and optimization of highly sensitive laboratory methods for practical use. These methods should allow to control effectively the bacteriosis agents in the early and subsequent stages of seed production, ensuring the production of high-quality seed.

Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatographic test systems in quality control schemes for seed potatoes allows to effectively detect the contamination of the test material with a latent form of the most harmful bacterial diseases [14, 15, 16, 17]. At the same time, the pathogens of potato bacteriosis *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. show great strain differences in the composition of cell surface antigens, which makes it difficult to identify and quantify them by immunological methods [18].

The whole genome sequencing of bacterial pathogens isolates causing potato blackleg opened up new possibilities for molecular diagnosis of pathogens [19, 20]. Apart from detecting minimal quantities of pathogens, using a highly sensitive PCR method allows to identify bacteria species [21]. Thus, using specific primers showed a wide spread of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* on potato plantings in Russia in autumn 2017 [22].

In 2019, within the framework of the Federal Scientific and Technical Program (FSTP) of agriculture development for 2017–2025, the RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center designed new test systems in real-time PCR (RT-PCR) for the diagnosis of bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* causing the blackleg of potato. A detailed description of the parameters and characteristics of the developed systems is given in the work of Stakheev et al., 2020 [23]. During testing, the developed test systems showed high specificity and analytical sensitivity for detecting the pathogen DNA at the level of 10–50 copies of plasmids, containing a specific PCR product, per reaction [23].

For further adaptation of the developed test systems in the practical work of diagnostic laboratories, it is necessary to test them in production conditions on material of different categories and classes grown in various regions of the Russian Federation. In this respect, the aim of the present work is studying the possibilities of using the new RT-PCR systems for the identification of potato blackleg agents when testing the seed material submitted to accredited testing laboratories for quality control and certification carried out in accordance with the existing standard protocol.

MATERIALS AND METHODS

During the research, 20 variety samples were analyzed delivered to the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center by manufacturers from 4 regions of the Russian Federation: Moscow, Tula, Voronezh Regions and the Republic of Tatarstan. Each variety sample contained 200 tubers belonging to different categories and classes of seed potato (7 samples of the 1st field generation from mini-tubers, 3 samples

и сертификации, осуществляемых в соответствии с существующим стандартным протоколом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследований анализировали 20 сортообразцов, поступивших в Испытательную лабораторию ФИЦ картофеля от производителей из 4 регионов Российской Федерации: Московской, Тульской, Воронежской областей и Республики Татарстан. Каждый сортобразец состоял из 200 клубней, относящихся к различным категориям и классам семенного картофеля (к 1-му полевому поколению из мини-клубней (ПП-1) относились 7 образцов, супер-суперэлите (ССЭ) – 3 образца, суперэлите (СЭ) – 2 образца, элите (Э) – 3 образца, 1-й репродукции элиты (РС-1) – 1 образец и 2-й репродукции элиты (РС-2) – 4 образца).

Для экстрагирования бактерий в 0,05 М калий-фосфатном буфере рН 7,0 использовали сегменты клубней из столонной части с захватом сосудистого кольца размером 1 x 1 см. Средние пробы образцов готовили в соответствии со СТО ВНИИКР 4.009-2013 [24]. Тотальную ДНК средних образцов выделяли с использованием комплектов реактивов «Проба-ГС» (для ДНК) (ООО «АгроДиагностика», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Каждый из образцов ДНК был протестирован в 3 повторностях. ПЦР-РВ проводили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология», Россия) в соответствии с программами амплификации, приведенными в статье Стахеева и др., 2020 [23]. Анализ полученных результатов проводили с использованием порогового метода [25].

Для сравнительной оценки полученных результатов исследуемые образцы параллельно тестировали с использованием коммерческих наборов для ИФА (ФИЦ картофеля¹) и ПЦР-РВ (ООО «Синтол»), применяемых в Испытательной лаборатории ФИЦ картофеля для рутинных анализов образцов на наличие бактерий, вызывающих черную ножку картофеля: *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani* (ИФА) и *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. (ПЦР-РВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поскольку в исходном и оригинальном семенном картофеле не допускается присутствие возбудителей бактериозов, в том числе вызывающих черную ножку картофеля (ГОСТ 33996-2016), контроль распространения фитобактерий на ранних стадиях семеноводства при выращивании оригинального семенного материала имеет первостепенное значение.

В наших исследованиях при тестировании 7 образцов исходного материала и 3 образцов супер-суперэлиты из различных регионов РФ с использованием тест-систем, применяемых в Испытательной лаборатории ФИЦ картофеля для рутинных анализов (ИФА ФИЦ картофеля² и ПЦР-РВ ООО «Синтол»), не были выявлены возбудители черной ножки картофеля. В то же время тестирование образцов с использованием новых тест-систем ПЦР-РВ позволило выделить дополнительно в 1-м полевом поколении из мини-клубней 2 сортообразца из Московской области и Республики Татарстан

of the super-super elite (S), 2 samples of the superelite (SE), 3 samples of the elite (E), 1 sample of the 1st elite reproduction (A1), and 4 samples of the 2nd elite reproduction (A2)).

To extract bacteria in 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.0 segments of tubers from the stolon part with a capture of the vascular ring measuring 1 x 1 cm were used. Average samples were prepared in accordance with STO VNIKR 4.009-2013 [24]. The total DNA of average samples was isolated using reagent kits “PREP-GS” (for DNA) (AgroDiagnostics, Russia) in accordance with the manufacturer’s protocol. Each of the DNA samples was tested in 3 replications. RT-PCR was performed in the DT-96 detection amplifier (DNA-Technology, Russia) in accordance with the amplification programs given in the article by Stakheev et al., 2020 [23]. The analysis of the obtained results was carried out using the threshold method [25].

For a comparative assessment of the results obtained, the studied samples were tested in parallel using commercial kits for ELISA (A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center¹) and RT-PCR (Syntol) used in the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center for routine tests of samples for bacteria causing potato blackleg: *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani* (ELISA) and *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. (RT-PCR).

RESEARCH RESULTS

Since the presence of bacteriosis agents is not allowed in the initial and original potato seeds, including those causing potato blackleg (GOST 33996-2016), controlling the spread of phyto bacteria in the early stages of seed production when growing original seed material is of paramount importance.

In this research, no agents of potato blackleg were detected when testing 7 samples of the initial material and 3 samples of super-super elite from different Russian regions with test systems used in the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center for routine tests (ELISA, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center² and RT-PCR, Syntol). At the same time, testing the samples with new RT-PCR test systems allowed to select additionally in the 1st field generation from mini tubers 2 variety samples from Moscow Region and the Republic of Tatarstan with a positive reaction to *Pectobacterium* respectively at the cycles of 28.4 and 26.4 and identify the pest as *Pectobacterium atrosepticum* (Table 1).

Amplification of the internal control was noted in all samples, which indicates the absence of the reaction inhibition and the correctness of the results. The graphs of the increasing fluorescent signal when testing the samples with primers for the detection of *P. atrosepticum* for specificity and internal control are shown in Fig. 1.

According to GOST 33996-2016, the potato bacteriosis identification including potato blackleg in elite

^{1,2} This method was developed earlier by VNIKH, which became A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center – since August 31, 2019.

Таблица 1
 Результаты тестирования образцов оригинального материала семенного картофеля (ПП-1 и ССЭ)

(в графе с данными ПЦР-РВ в скобках приведены средние значения пороговых циклов по 3 повторностям)

№ п.п. Образец	Результаты тестирования							
	ИФА (оптическая плотность)		ПЦР-РВ (C _q ср.)					
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Невский (ПП-1) Р. Татарстан	–	–	–	–	–	+	–	–
						(26,4)		
2. Гала (ПП-1) Р. Татарстан	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Импала (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
4. Фиолетовый (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	+	–	–
						(28,4)		
5. Дезире (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
6. Ред Скарлетт (ПП-1) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
7. Жуковский р. (ПП-1) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–
8. Ред Скарлетт (ССЭ) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Ред Скарлетт (ССЭ) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Удача (ССЭ) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–

P. atro – *Pectobacterium atrosepticum*

D. dian – *Dickeya dianthicola*

P. spp. – *Pectobacterium* spp.

D. spp. – *Dickeya* spp.

D. sol – *Dickeya solani*

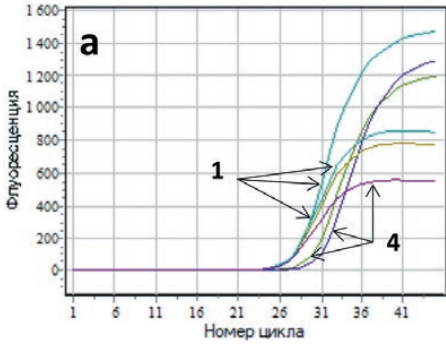


Рис. 1. Графики разгорания флуоресцентного сигнала при тестировании образцов оригинального материала семенного картофеля с праймерами к *P. atrosepticum*: а – специфика; б – внутренний контроль. 1 – образец 1; 4 – образец 4 (см. табл. 1) (3 повторности)

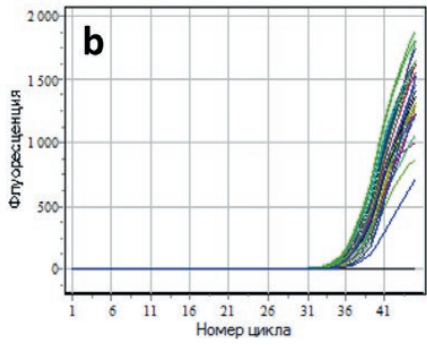


Рис. 1. The graphs of increasing fluorescent signal when testing samples of original seed potato material with primers for *P. atrosepticum*: а – specific sample; б – internal control. 1 – sample 1; 4 – sample 4 (see Table 1) (3 replications)

с положительной реакцией на *Pectobacterium* соответственно на 28,4 и 26,4 цикле и идентифицировать возбудителя как *Pectobacterium atrosepticum* (табл. 1).

Амплификация внутреннего контроля была отмечена во всех образцах, что свидетельствует об отсутствии ингибирования реакции и о корректности

al test system (Table 2). A total coincidence was noted in 7 cases by 4 negative and 3 positive reactions by all

^{1,2} Данный метод был разработан ранее ВНИИХ, который стал ФИЦ картофеля – с 31 августа 2019 г.

Table 1
Test results of original potato seed material samples (1st field generation and super-super elite)
 (in the column with RT-PCR data in brackets are the average values of the threshold cycles for 3 replications)

№ Sample	Test results							
	ELISA (optical density)			RT-PCR (C _q cp.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Nevsky (A1*) Republic of Tatarstan	–	–	–	–	–	+	–	–
						(26.4)		
2. Gala (A1) Republic of Tatarstan	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Impala (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
4. Purple (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	+	–	–
						(28.4)		
5. Desire (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
6. Red Scarlett (A1) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
7. Zhukovsky (A1) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
8. Red Scarlett (super-super elite) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Red Scarlett (super-super elite) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Udacha (super-super elite) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>P. atro</i> – <i>Pectobacterium atrosepticum</i>		<i>P. spp.</i> – <i>Pectobacterium</i> spp.			<i>D. sol</i> – <i>Dickeya solani</i>			
<i>D. dian</i> – <i>Dickeya dianthicola</i>		<i>D. spp.</i> – <i>Dickeya</i> spp.			* – see ‘Materials and Methods’			

полученных результатов. Графики разгорания флуоресцентного сигнала при тестировании образцов с праймерами для детекции *P. atrosepticum* для спецификации и внутреннего контроля приведены на рисунке 1.

В соответствии с ГОСТ 33996-2016 идентификация бактериозов картофеля, в том числе черной ножки, в элитном и репродукционном семеноводстве картофеля осуществляется визуальными методами как на вегетирующих растениях во время полевых инспекций, так и на клубнях с использованием клубневого анализа материала. В то же время, с учетом возможного латентного характера инфекции, лабораторный контроль за распространением возбудителей болезни в процессе размножения элитного и репродукционного семенного картофеля является важным элементом контроля качества материала.

В наших исследованиях при сравнительном тестировании 10 сортообразцов элитного и репродукционного семенного картофеля 3 тест-системами было выявлено значительное совпадение результатов, полученных с использованием 2 рутинных и испытуемой тест-системы (табл. 2). В 7 случаях было выявлено полное совпадение по 4 отрицательным и 3 положительным реакциям всеми 3 тест-системами. Так, при тестировании образца элиты с. Гала, произведенного в Московской

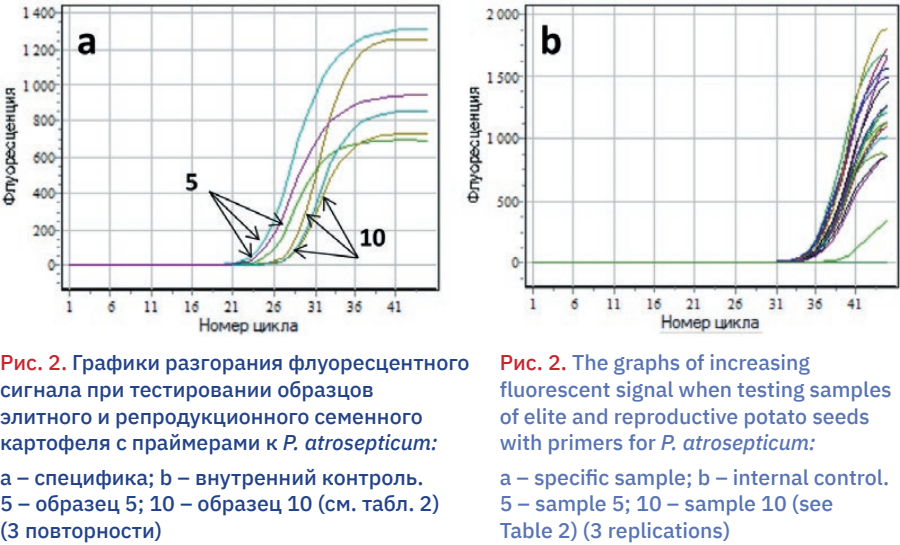
3 test systems. Thus, testing a sample of the elite variety Gala produced in Moscow Region and reproduction material of the variety Picasso (A2) from Voronezh Region showed positive reactions for the presence of *Pectobacterium atrosepticum* in the material by ELISA (optical density – 2.15 and 0.16), *Pectobacterium* spp. by RT-PCR (Syntol) at the cycles of 26.7 and 35.1 and *Pectobacterium atrosepticum* using the new test system of RT-PCR at the cycles of 26.0 and 28.3 respectively. The graphs of fluorescent signal increase when testing the samples with primers for the detection of *P. atrosepticum* are given in Fig. 2.

The presence of the bacterium *Dickeya solani* was also unambiguously detected in the sample of the variety Sifra (A2) from Voronezh Region by ELISA (optical density – 2.28), *Dickeya* spp. by RT-PCR (Syntol) at the cycle of 35.2 and *Dickeya solani* using the new test system RT-PCR at the cycle of 29.7.

The testing of two elite samples from Moscow Region (Queen Anna and Colombo) and the sample of the variety Gala (elite reproduction-1) from Voronezh Region showed positive reactions for the bacteria *Pectobacterium* spp. by RT-PCR (Syntol) (average numbers

Таблица 2
Результаты тестирования образцов элитного и репродукционного семенного картофеля
 (в графе с данными ПЦР-РВ в скобках приведены средние значения пороговых циклов по 3 повторностям)

№ п.п. Сортообразец	Результаты тестирования							
	ИФА (оптическая плотность)			ПЦР-РВ (C _q ср.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Ред Скарлетт (СЭ) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
2. Удача (СЭ) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Королева Анна (Э) Московская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(31,1)				
4. Коломбо (Э) Московская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(33,1)				
5. Гала (Э) Московская область	+	–	–	+	–	+	–	–
	(2,15)			(26,7)		(26,0)		
6. Гала (РС-1) Воронежская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(34,3)				
7. Сифра (РС-2) Воронежская область	–	–	+	–	+	–	–	+
			(2,28)		(35,2)			(29,7)
8. Гала (РС-2) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Эволюшн (РС-2) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Пикассо (РС-2) Воронежская область	+/-	–	–	+	–	+	–	–
	(0,16)			(35,1)		(28,3)		
<i>P. atro</i> – <i>Pectobacterium atrosepticum</i>		<i>P. spp.</i> – <i>Pectobacterium</i> spp.			<i>D. sol</i> – <i>Dickeya solani</i>			
<i>D. dian</i> – <i>Dickeya dianthicola</i>		<i>D. spp.</i> – <i>Dickeya</i> spp.						



области, и репродукционного материала с. Пикассо (РС-2) из Воронежской области были получены положительные реакции на присутствие в материале *Pectobacterium atrosepticum* методом ИФА (оптическая плотность – 2,15 и 0,16), *Pectobacterium* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») на 26,7 и 35,1 циклах и *Pectobacterium atrosepticum* с использованием новой

of the threshold cycles: 31.1, 33.1 and 34.3 respectively). Also, when using ELISA and the new RT-PCR test systems for the testing no blackleg of potato agents were detected in these samples.

CONCLUSION

The comparative testing of 20 variety samples of potato seeds received by the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center from producers from 4 Russian regions showed in 15 cases a full coincidence of the analysis results using 2 routine and 1 trial test system (12 negative and 3 positive reactions). Using the new RT-PCR test system in the early stages of seed production to test original potato seeds

Table 2
Results of testing samples of elite and reproductive potato seeds
 (in the column with RT-PCR data in brackets are the average values of the threshold cycles for 3 replications)

№ Variety sample	Test results							
	ELISA (optical density)			RT-PCR (C _q ср.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Red Scarlett (super elite) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
2. Udacha (super elite) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Queen Anna (elite) Moscow region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(31.1)				
4. Colombo (elite) Moscow region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(33.1)				
5. Gala (elite) Moscow region	+	–	–	+	–	+	–	–
	(2.15)			(26.7)		(26.0)		
6. Gala (A1) Voronezh region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(34.3)				
7. Sifra (A2) Voronezh region	–	–	+	–	+	–	–	+
			(2.28)		(35.2)			(29.7)
8. Gala (A2) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Evolution (A2) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Picasso (A2) Voronezh region	+/-	–	–	+	–	+	–	–
	(0.16)			(35.1)		(28.3)		

P. atro – *Pectobacterium atrosepticum*
D. dian – *Dickeya dianthicola*

P. spp. – *Pectobacterium* spp.
D. spp. – *Dickeya* spp.

D. sol – *Dickeya solani*

тест-системы ПЦР-РВ на 26,0 и 28,3 циклах соответственно. Графики разгорания флуоресценции при анализе образцов с праймерами к *P. atrosepticum* приведены на рисунке 2.

Также однозначно выявляли присутствие в образце с. Сифра (РС-2) из Воронежской области бактерии *Dickeya solani* методом ИФА (оптическая плотность – 2,28), *Dickeya* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») на 35,2 цикле и *Dickeya solani* с использованием новой тест-системы ПЦР-РВ на 29,7 цикле.

При тестировании 2 образцов элиты из Московской области (Королева Анна и Коломбо) и образца с. Гала (РС-1), поступившего из Воронежской области, были получены положительные реакции на бактерии *Pectobacterium* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») (средние значения пороговых циклов: 31,1, 33,1 и 34,3 соответственно). Вместе с тем при использовании для тестирования метода ИФА и новых тест-систем ПЦР-РВ в данных образцах не было выявлено присутствие возбудителей черной ножки картофеля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном тестировании 20 сортообразцов семенного картофеля, поступивших в Испытательную лабораторию Федерального исследовательского центра картофеля имени А.Г. Лорха от производителей из 4 регионов Российской Федерации, в 15 случаях показано полное совпадение

allowed to detect additionally 2 samples with a positive reaction to *Pectobacterium atrosepticum*. The conducted research has shown the possibility of using the test systems developed within the Federal Scientific and Technical Program of agriculture development for 2017–2025 (subprogram “Development of potato and seed production in the Russian Federation”) for the detection and identification of potato blackleg agents.

REFERENCES

- Ivanyuk V.G., Banadysev S.A., Zhuromsky G.K. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds [Zashita kartofelya ot bolezney, vreditely i sornyakov]. Minsk: Belprint, 2005. 696 p. (In Russian.)
- Zeyruk V.N., Zhevora S.V., Vasilyeva S.V., Belov G.L., Dolzhenko V.I., Kuznetsova M.A., Anisimov B.V., Elansky S.N. Potato diseases, pests, weeds and measures to control them [Bolezni, vrediteli, sornyaki kartofelya i meropriyatiya po borbe s nimi]. M.: FSUE “Publishing house “Nauka”, 2020. 332 p. (In Russian.)
- Karlov A.N., Zotov V.S., Pekhtereva E.S., Matveeva E.V., Dzhalilov F.S., Fesenko I.A., Karlov G.I., Ignatov A.N. *Dickeya dianthicola* – new for Russia bacterial pathogen of potatoes [*Dickeya dianthicola* – novy dlya

результатов анализа при использовании 2 рутинных и 1 испытуемой тест-системы (12 отрицательных и 3 положительные реакции). Использование новой тест-системы ПЦР-РВ на ранних этапах семеноводства для тестирования оригинального семенного картофеля позволило выделить дополнительно 2 образца с положительной реакцией на *Pectobacterium atrosepticum*. Проведенными исследованиями показана возможность использования разработанных в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации») тест-систем для выявления и идентификации возбудителей черной ножки картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. – Минск: Белпринт, 2005. – 696 с.
- Болезни, вредители, сорняки картофеля и мероприятия по борьбе с ними / В.Н. Зейрук, С.В. Жевора, С.В. Васильева, Г.Л. Белов, В.И. Долженко, М.А. Кузнецова, Б.В. Анисимов, С.Н. Еланский. – М.: ФГУП «Издательство «Наука», 2020. – 332 с.
- Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С., Фесенко И.А., Карлов Г.И., Игнатов А.Н. *Dickeya dianthicola* – новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия ТСХА. – 2010. – № 3. – С. 134–141.
- Карлов А.Н., Игнатов А.Н., Карлов Г.И., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Шаад Н.В., Варицев Ю.А., Джалилов Ф.С. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola* // Известия ТСХА. – 2011. – № 3. – С. 38–48.
- Игнатов А.Н., Лазарев А.М., Панычева Ю.С., Проворов Н.А., Чеботарь В.К. Бактериальные патогены картофеля рода *Dickeya*: мини-обзор по систематике и этиологии заболеваний // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 1. – С. 123–131.
- Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör L., Eiphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // Plant Pathology. – 2011. – Vol. 60. – P. 385–399.
- Игнатов А.Н., Карлов А.Н., Джалилов Ф.С., Карандашов А.Е., Князькина М.С., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш. Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya* // Защита и карантин растений. 2014. – № 11. – С. 41–43.
- Ареалы и зоны вредоносности основных бактериозов растений на территории России и сопредельных стран / А.М. Лазарев, Е.Н. Мыслик, Ю.А. Варицев, И.А. Зайцев, А.П. Кожемяков, Ф.А. Попов, С.А. Волгарев, В.К. Чеботарь. – Санкт-Петербург: ВИЗР, 2017. – 136 с.
- Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б.В. Анисимов, Г.Л. Белов, Ю.А. Варицев, С.Н. Еланский, Г.К. Журомский, С.К. Завриев, В.Н. Зейрук, В.Г. Иванюк, М.А. Кузнецова, М.П. Пляхневич, К.А. Пшеченков, Е.А. Симаков, Н.П. Скларова, З. Сташевски, А.И. Усков, И.М. Яшина. – М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.
- Надточий И.Н., Лазарев А.М., Зайцев И.А., Варицев Ю.А. К вопросу распространенности

Rosii bakterialny patogen kartofelya]. *Izvestiya TSKhA*. 2010; 3: 134–141. (In Russian.)

4. Karlov A.N, Ignatov A.N, Karlov G.I, Pekhtereva E.S., Matveeva E.V, Shaad N.V, Varitsev Y.A., Jalilov F.S. Diagnosis of the potato bacterial pathogen *Dickeya dianthicola* [Diagnostika bakterialnogo patogena kartofelya *Dickeya dianthicola*]. *Izvestiya TSKhA*. 2011; 3: 38–48. (In Russian.)

5. Ignatov A.N., Lazarev A.M., Panycheva Yu.S., Provorov N.A., Chebotar V.K. Potato bacterial pathogens of the genus: mini-review on the taxonomy and etiology of diseases [Bakterialnye patogeny kartofelya roda *Dickeya*: mini-obzor po sistematike i etilologii zabolevaniy]. *Agricultural Biology*. 2018; 53 (1): 123–131. (In Russian.)

6. Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör L., Eiphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. 2011; 60: 385–399.

7. Ignatov A.N., Karlov A.N., Jalilov F.S., Karandashov A.E., Knyazkina M.S., Kornev K.P., Pekhtereva E.S. The spreading in Russia of potato blackleg caused by *Dickeya* spp. [Rasprostranenie v Rossii chernoy nozhki kartofelya vyzyvaemoy bakteriyami roda *Dickeya*]. *Plant protection and quarantine*. 2014; 11: 41–43. (In Russian.)

8. Lazarev A.M., Mysnik E.N., Varitsev Y.A., Zaitsev I.A., Kozhemyakov A.P., Popov F.A., Volgarev S.A., Chebotar V.K. Areas and zones of harmfulness of the main plant bacterioses on the territory of Russia and neighboring countries [Arealy i zony vredonosnostu osnovnykh bakteriozov rasteniy na territorii Rossii i sopredelnykh stran]. St. Petersburg: VIZR, 2017. 136 p. (In Russian.)

9. Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev Y.A., Elansky S.N., Zhuromsky G.K., Zavriev S.K., Zeyruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov E.A., Sklyarova N.P., Stashevsky Z., Uskov A.I., Yashina I.M. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds [Zashita kartofelya ot bolezney, vreditely i sornyakov]. M.: Kartofelevod, 2009. 272 p. (In Russian.)

10. Nadtochiy I.N., Lazarev A.M., Zaitsev I.A., Varitsev Y.A. On the prevalence and harmfulness of blackleg of potato caused by bacteria of the genus *Pectobacterium* [K voprosu o rasprostranennosti i vredonosnosti chernoy nozhki kartofelya, vyzyvayemoy bakteriyami roda *Pectobacterium*]. Potato growing. Collection of scientific papers. Materials of the international scientific and practical conference: “Methods of biotechnology in breeding and seed production of potatoes.” M.: GNU VNIKH Russian Agricultural Academy, 2014: 225–230. (In Russian.)

11. Ignatov A.N. It is necessary to increase the control of potato bacteriosis [Neobhodimo usilit borbu s bakteriozami kartofelya]. *Potatoes and vegetables*. 2011; 5: 28–29. (In Russian.)

12. Zaitsev I.A., Varitseva Yu.A., Lazarev A.M., Galushka P.A., Varitseva G.P. Monitoring of latent forms of spread of potato black leg and ring rot pathogens in the Russian Federation [Monitoring skrytykh (latentnykh) form rasprostraneniya vzbuditeley chernoy nozhki i koltsevoy gnili kartofelya v Rossiyskoy Federatsii]. Collection of scientific papers on the results of the

и вредоносности черной ножки картофеля, вызываемой бактериями рода *Pectobacterium* // В кн.: Картофелеводство. Сборник научных трудов. Материалы международной научно-практической конференции: «Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля». – М.: ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии, 2014. – С. 225–230.

11. Игнатов А.Н. Необходимо усилить борьбу с бактериозами картофеля // Картофель и овощи. – 2011. – № 5. – С. 28–29.

12. Зайцев И.А., Варицев Ю.А., Лазарев А.М., Галушка П.А., Варицева Г.П. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // В кн.: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Сельскохозяйственные науки: научные приоритеты ученых» (г. Пермь, 25 ноября 2016 г.). – Пермь, 2016. – № 1. – С. 39–56.

13. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества». – М.: Стандартинформ, 2017. – 31 с.

14. Усков А.И., Варицев Ю.А., Варицева Г.П., Галушка П.А., Ускова Л.Б., Анисимов Б.В. Современные тест-системы для лабораторной диагностики вирусных и бактериальных патогенов картофеля // В кн.: Селекция и семеноводство картофеля // Монография / Кол. авт. под ред. С.В.Жеворы, Е.А. Симаква, Б.В. Анисимова. – Чебоксары, 2020. – С. 131–138.

15. Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Карлов А.Н., Варицева Г.П., Усков А.И. Иммуноферментный анализ возбудителей черной ножки картофеля // Картофель и овощи. – 2014. – № 6. – С. 28–29.

16. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Pectobacterium atrosepticum* // Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2015. – Vol. 12, № 3. – P. 1937–1945.

17. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species // Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2017. – Vol. 409. – P. 1915–1927.

18. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции / Варицев Ю.А., Усков А.И., Белов Г.Л., Варицева Г.П., Завриев С.К., Аршава Н.В., Зайцев В.В. – М.: ВНИИКХ, 2003. – 30 с.

19. Khayi S., Blin P., Chong T.M., Chan K.G., Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222 (T) // Standards in Genomic Sciences. – 2016. – Vol. 11. – P. 87. – URL: <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0208-0>.

20. Shneider M.M., Kabanova A.P., Korzhnikov A.A., Miroshnikov K.K., Thi N.H.V., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. Draft genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* PB72 and complete genome sequence of the specific bacteriophage PP90 // Genome Announcements. – 2018. – Vol. 6: e00473-18. – URL: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00473-18>.

international scientific and practical conference “Agricultural Sciences: Scientific Priorities of Scientists” (Perm, November 25, 2016). Perm, 2016. No. 1: 39–56. (In Russian.)

13. Interstate standard GOST 33996-2016 “Seed potatoes. Technical conditions and methods for determining quality” [Kartofel semennoy. Tehnicheskiye usloviya i metody opredeleniya kachestva]. M.: Standartinform, 2017. 31 p. (In Russian.)

14. Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Varitseva G.P., Galushka P.A., Uskova L.B., Anisimov B.V. Modern test systems for laboratory diagnostics of viral and bacterial pathogens of potatoes [Sovremennyye test-sistemy dlya laboratornoy diagnostiki virusnykh i bakterialnykh patogenov kartofelya]. Potato breeding and seed production. Monograph. Col. ed. S.V. Zhevory, E.A. Simakova, B.V. Anisimova. Cheboksary, 2020: 131–138. (In Russian.)

15. Varitsev Yu.A., Zaitsev I.A., Karlov A.N., Varitseva G.P., Uskov A.I. Enzyme-linked immunosorbent assay of the potato blackleg agents [Immunifermentny analiz vozbuditeley chernoy nozhki kartofelya]. *Potatoes and vegetables*. 2014; 6: 28–29. (In Russian.)

16. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Pectobacterium atrosepticum* // *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2015; 12 (3): 1937–1945.

17. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2017; 409: 1915–1927.

18. Varitsev Yu.A., Uskov A.I., Belov G.L., Varitseva G.P., Zavriev S.K., Arshava N.V., Zaitsev V.V. Methodology guidelines for the diagnosis of potato black leg and ring rot causative agents by enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence microscopy and polymerase chain reaction [Metodicheskiye ukazaniya po diagnostike vozbuditeley chernoy nozhki i koltsevoy gnili kartofelya metodami immunofermentnogo analiza, immunofluorescentnoy mikroskopii i polimeraznoy tsepnoy reaktsii]. M.: VNIKH, 2003. 30 p. (In Russian.)

19. Khayi S., Blin P., Chong T.M., Chan K.G., Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222 (T). *Standards in Genomic Sciences*. 2016; 11: 87. URL: <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0208-0>.

20. Shneider M.M., Kabanova A.P., Korzhnikov A.A., Miroshnikov K.K., Thi N.H.V., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. Draft genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* PB72 and complete genome sequence of the specific bacteriophage PP90. *Genome Announcements*. 2018; 6: e00473-18. URL: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00473-18>.

21. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhnikov A.A., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019; 103 (2): 364.

21. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhnikov A.A., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia // Plant Disease. – 2019. – V. 103, No. 2. – P. 364.

22. Карандашов В. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – основной бактериальный патоген картофеля осенью 2017 г. – Москва, 2017. – 8 с. URL: <https://docplayer.ru/140501832-Pectobacterium-carotovorum-subsp-brasiliensis-osnovnoy-bakterialnyy-patogen-kartofelya-osenyu-2017-g.html> (дата обращения: 29.06.2020).

23. Стахеев А.А., Чigareva М.С., Усков А.И., Шмыгля И.В., Варицев Ю.А., Галушка П.А., Завриев С.К. Разработка новых систем ПЦР-идентификации некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), распространенных на территории России // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, № 1. – С. 77–86.

24. СТО ВНИИР 4.009-2013 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации» / п. Быково, Московская обл.: ФГБУ «ВНИИР», 2013. – 69 с.

25. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55, No. 4. – P. 611–622. – URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Усков Александр Иринархович, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Шмыгля Ирина Валентиновна, старший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Стахеев Александр Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия.

Завриев Сергей Кириакович, доктор биологических наук, чл.-корреспондент РАН, заведующий отделом ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия.

Варицев Юрий Алексеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Галушка Павел Андреевич, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Сулова Нора Владимировна, младший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

22. Karandashov V. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – major bacterial pathogen of potatoes in autumn 2017 [*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – osnovnoy bakterialny patogen kartofelya osenyu 2017]. Moscow, 2017. 8 p. URL: <https://docplayer.ru/140501832-Pectobacterium-carotovorum-subsp-brasiliensis-osnovnoy-bakterialnyy-patogen-kartofelya-osenyu-2017-g.html> (last accessed: 29.06.2020). (In Russian.)

23. Stakheev A.A., Chigareva M.S., Uskov A.I., Shmyglya I.V., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Zavriev S.K. Development of new PCR systems for identification of non-quarantine potato pathogens (*Solanum tuberosum* L.) widespread in Russia [Razrabotka novykh system PCR-identifikatsii nekarantinnykh patogenov kartofelya (*Solanum tuberosum* L.), rasprostranennykh na territorii Rossii]. *Agricultural biology*. 2020; 55 (1): 77–86. (In Russian.)

24. STO VNIIR 4.009-2013 “Potato brown rot agent *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and identification methods” [Vozbuditel buroy bakterialnoy gnili kartofelya *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Metody vyavleniya i identifikatsii]. Bykovo, Moscow region: FGBU “VNIIR”, 2013. 69 p. (In Russian.)

25. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR. *Clinical Chemistry*. 2009. 55 (4): 611–622. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr Uskov, Doctor of Agriculture, Leading Researcher and Head of Department, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Irina Shmyglya, Senior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Aleksandr Stakheev, PhD in Biology, Researcher of RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

Sergey Zavriyev, Doctor of Biology, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Head of Department, RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

Yury Varitsev, PhD in Biology, Leading Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Pavel Galushka, PhD in Agriculture, Senior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Nora Suslova, Junior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.