

Выявление патогенов картофеля с использованием различных методов диагностики

А. Р. Пухаев, И. О. Газданова✉

Федеральный научный центр «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, Россия

✉E-mail: gazdanovaira2020@gmail.com

Аннотация. Болезни картофеля имеют далеко идущие последствия для сельскохозяйственной отрасли, поскольку они не только снижают продуктивность и качество урожая картофеля, но и негативно влияют на средства к существованию фермеров. **Цель** исследований – обнаружение и идентификация фитопатогенов картофеля методами визуальной оценки, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и молекулярно-генетического скрининга на гены устойчивости к фитопатогенам. **Методы.** Визуальную оценку каждого сортообразца картофеля на основные грибные, вирусные и бактериальные болезни проводили в период полных всходов, при высоте растений 15–20 см и в фазу полного цветения. Рассчитывали процент растений, пораженных болезнями, по отношению к общему количеству осмотренных растений. Диагностика устойчивости образцов картофеля к болезням проведена на основе ПЦР. Для молекулярного скрининга картофеля использовали ДНК-маркеры генов устойчивости к фитопатогенам *YES3-3A*, *RYSC3*, *Ry186*, *TG 689*, *Gro1-4-1*, *Gpa2-2*, *PVX*. Зараженность образцов методом ПЦР-РВ (в реальном времени) определяли с использованием наборов реагентов компании ООО «Синтол» Potato Virus X и Potato Virus Y-РВ, Potato spindle tuber viroid-РВ, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-РВ, *Dickeya* spp.-РВ. **Результаты.** По результатам визуальной оценки отмечено отсутствие симптомов морщинистой мозаики у 20 % гибридов, крапчатой мозаики – у 40 %, мозаичного закручивания листьев – у 96 %, скручивания листьев – у 72 % гибридов, черной ножки – у 100 %, фитофтороза – у 88 %, альтернариоза – у 84 %, ризоктониоза – у 96 % гибридов. По результатам анализа ПЦР-РВ в 21 образце обнаружен вирус Y. **Научная новизна** состоит в диагностике вирусов картофеля с использованием традиционной визуальной оценки с применением молекулярных маркеров, которые позволяют выявить корреляционную связь между данными методами.

Ключевые слова: картофель, гибрид, болезни, вирус, анализ, ген, нематода, вирус X, Y, фитофтороз, черная ножка

Для цитирования: Пухаев А. Р., Газданова И. О. Выявление патогенов картофеля с использованием различных методов диагностики // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 08. С. 1007–1017. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-08-1007-1017>.

Дата поступления статьи: 02.04.2024, **дата рецензирования:** 21.05.2024, **дата принятия:** 17.06.2024.

Identification of potato pathogens using different diagnostic methods

A. R. Pukhaev, I. O. Gazdanova✉

Federal Scientific Center “Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”, Vladikavkaz, Russia

✉E-mail: gazdanovaira2020@gmail.com

Abstract. Potato diseases have far reaching implications for the agricultural industry as they not only reduce productivity and quality of potato crop but also negatively affect the livelihood of farmers. **The purpose** of the studies detection and identification of potato phytopathogens by visual assessment, real time polymerase chain reaction (PCR) and molecular genetic screening for phytopathogen resistance genes. **Methods.** Visual evaluation of each

potato variety for major fungal, viral and bacterial diseases was carried out during the period of full sprouting, at plant height of 15–20 cm and in the phase of full flowering. The percentage of plants affected by diseases in relation to the total number of inspected plants was calculated. Diagnosis of resistance of potato samples to diseases was carried out on the basis of PCR. DNA markers of phytopathogen resistance genes YES3-3A, RYSC3, Ry186, TG 689, Gro1-4-1, Gpa2-2, PVX were used for molecular screening of potato. Infection of samples by PCR-RV (real-time) was determined using reagent kits of Syntol LLC Potato Virus X and Potato Virus Y, Potato spindle tuber viroid-PB, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-PB, *Dickeya* spp-PB. **Results.** According to the results of visual evaluation, the absence of symptoms of wrinkle mosaic in 20 % of hybrids, mottle mosaic in 40 %, mosaic leaf curl in 96 %, leaf curl in 72 hybrids, black leg in 100 %, phytophthorosis in 88 % of hybrids, alternaria in 84 %, rhizoctoniosis in 96 % of hybrids were observed. According to the results of PCR-RV analysis in 21 samples detected virus Y. **The scientific novelty** consists in the diagnosis of potato viruses using traditional visual assessment with the use of molecular markers that allow to identify correlation relationship between trhis methods.

Keywords: potato, hybrid, diseases, virus, analysis, gene, nematode, virus X, Y, phytophthorosis, black leg

For citation: Pukhaev A. R., Gazdanova I. O. Identification of potato pathogens using different diagnostic methods. *Agrarian Bulletin of the Urals*. 2024; 24 (08): 1007–1017. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-08-1007-1017>. (In Russ.)

Date of paper submission: 02.04.2024, **date of review:** 21.05.2024, **date of acceptance:** 17.06.2024.

Постановка проблемы (Introduction)

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – важная основная культура во всем мире, играющая решающую роль в удовлетворении пищевых потребностей миллионов людей и вносящая существенный вклад в мировую экономику [1]. [2]. Несмотря на важность выращивания картофеля, существует ряд проблем – в первую очередь из-за различных болезней, которые могут привести к значительному снижению урожая и его качества. Раннее и точное выявление этих болезней имеет жизненно важное значение для реализации эффективных стратегий управления и обеспечения устойчивого производства этой культуры [3; 4]. Нехватка продовольствия становится все более острой проблемой в развивающихся странах, где картофель служит основным продуктом питания в течение всего года. Снижение производства картофеля в первую очередь связано с воздействием различных заболеваний, таких как фитофтороз, вирусные болезни, кольцевая гниль, черная ножка, нематодозы, которые приводят к значительным потерям урожая и имеют существенные экономические последствия. Раннее и точное обнаружение проявления болезней в сельскохозяйственных культурах является ключом к снижению как качественных, так и количественных потерь урожая [5; 6].

Картофель является гетеротетраплоидным растением, и вывести сорта с высокой вирусоустойчивостью с помощью традиционных методов селекции довольно сложно. Традиционные методы визуальной диагностики болезней картофеля трудоемки, требуют много времени и часто сопряжены с риском ошибок [7]. Быстрая диагностика и точная идентификация этих заболеваний имеют решающее значение для эффективного контроля и профилак-

тики болезней. Молекулярные методы быстрого обнаружения и идентификации возбудителей являются мощными инструментами диагностики заболеваний [8].

Эра разработки и применения молекулярных маркеров началась в 1980-х годах. За этой вехой в геномных исследованиях растений десять лет спустя последовало создание ДНК-маркеров на основе ПЦР. С тех пор сообщалось о применении многих молекулярных маркеров в различных аспектах молекулярной селекции и геномики растений. Маркер-опосредованная селекция (МОС) (англ. MAS – marker assisted selection или marker aided selection) – это метод молекулярной селекции, основной принцип которого заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций «маркер – признак» в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий. МОС в основном используется в селекционном процессе для идентификации подходящих доминантных или рецессивных аллелей при выявлении и подборе родительских форм, обладающих наилучшими характеристиками, и при идентификации наиболее благоприятных особей в сегрегирующемся гибридном потомстве [11]. Применение метода МОС в сочетании с методами классической селекции существенно сокращает размер выборки, количество этапов и время, необходимое для создания новых генотипов/сортов растений [12; 13].

Методология и методы исследования (Methods)

Полевой эксперимент проводился на опытном поле ООО «ФАТ АГРО» пригородного района РСО-Алания. Почва опытного поля представлена выщелоченным черноземом, подстилаемый галечником. Содержание гумуса – от 4,2 до 5,5 %. Реак-

ция почвенного раствора – слабкокислая или близкая к нейтральной (5,7–6,4). Средняя многолетняя норма осадков, выпадающих за год, составляет 748 мм. Сезонная их динамика постепенно нарастает от зимы к лету, достигая максимума в июне (143 мм). В дальнейшем выпадение осадков снижается, достигая минимума в декабре – феврале (20–27 мм). Относительная влажность воздуха в зоне за вегетационный период составляет около 74 %.

Агрометеорологические условия вегетационного периода 2023 года были неоптимальными для роста и развития растений картофеля.

Пораженность растений картофеля основными грибными, вирусными и бактериальными болезнями оценивали путем визуального обследования каждого сортообразца. Исследования проводили в период полных всходов, при высоте растений 15–20 см и фазу полного цветения. Рассчитывали процент растений, пораженных болезнями, по отношению к общему количеству осмотренных растений.

Исследования с применением техник молекулярной биологии выполнялись на базе Лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных растений ВНИЦ РАН с использованием приборно-аппаратной линии для проведения ПЦР-анализа. Для выделения растительной ДНК использовали листья образцов картофеля, собранные в период цветения.

Оценка содержания патогенов в образцах картофеля осуществлялась на основе выявления РНК методом ПЦР-анализа в реальном времени. Выделение вирусной РНК из собранных листьев картофеля проводили с использованием набора «Фитосорб-П» на магнитных частицах компании ООО «Синтол». Зараженность образцов определяли с использованием наборов реагентов Potato Virus X и Potato Virus Y-PV, Potato spindle tuber viroid-PV, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*-PV, *Dickeya* spp.-PV. Интерпретация результатов ОТ-ПЦР-PV была проведена в программе АНК-48 по инструкции ООО «Синтол».

Молекулярно-генетический анализ селекционного питомника на устойчивость к фитопатогенам проводили с использованием молекулярных маркеров генов устойчивости картофеля к золотистой (*Globodera rostochiensis*) и бледной (*Globodera pallida*) нематодам, вирусам X и Y. Геномную ДНК выделяли набором реагентов «ДНК-Экстра-3» (компания «Синтол», Россия) для выделения ДНК из тканей растений согласно инструкции, прилагаемой к набору.

Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MiniAmp Plus (Thermo FS). Стандартная реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10X буфер для Таq ДНК-полимеразы (ООО «Синтол»), 2,5 мМ смесь dNTP (компания ООО «Диаэм»), 25 мМ водный раствор хлорида магния (Fermentas LLC),

5–10 пкмоль каждого праймера (ООО «Синтол»), 20 нг пробы ДНК и 13–10 мкл автоклавированной бидистиллированной воды. Присутствие специфического фрагмента детектировали электрофоретическим разделением продуктов амплификации в 1,5-процентном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Маркеры основных доминантных генов устойчивости к фитопатогенам картофеля для молекулярного скрининга были отобраны на основе анализа литературных данных [14–16].

Цель работы – выявление заболеваний картофеля с использованием различных методов диагностики фитопатогенов.

Результаты (Results)

Создание новых сортов картофеля, сочетающих высокий потенциал урожайности, устойчивости к фитопатогенам и высокой пластичности, является существенным резервом увеличения производства продукции картофелеводства в данном регионе. Важной задачей для селекционеров является выделение сортов картофеля с комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, что связано с большими трудностями в связи с большим разнообразием возбудителей грибных и вирусных заболеваний, а также их рас и штаммов [17]. В период вегетации при высоте растений картофеля 15–25 см и в фазу цветения проведены две визуальных оценки и фито- и сортопрочистки. Данные по результатам оценки гибридов приведены в таблице 1. Развитие растений в период вегетации оценивали по стартовому росту, типу и мощности куста (в баллах), степени устойчивости к вирусным, грибным и бактериальным болезням. Особое внимание уделяли фитофтороустойчивости.

Часть гибридов выбракована из-за сильного отставания в развитии или проявления симптомов поражения ботвы вирусами. В целом же развитие гибридов отмечено как хорошее. В течение вегетации проводились фитопатологический мониторинг устойчивости сортов картофеля к наиболее распространенным заболеваниям и исследования особенностей развития основных болезней в погодных условиях 2023 года в Северо-Кавказском регионе. Оценку осуществляли визуальным методом, оценивая каждое растение в периоды полных всходов, при высоте растений 15–20 см и в период цветения. Рассчитывали процент растений, пораженных болезнями, по отношению к общему количеству.

При визуальной оценке растений в фазу цветения по ботве было отмечено отсутствие симптомов морщинистой мозаики у 20 % гибридов, крапчатой мозаики – у 40 %, мозаичного закручивания листьев – у 96 %, скручивания листьев – у 72 % гибридов, черной ножки – у 100 %, фитофтороза – у 88 % гибридов, альтернариоза – у 84 %, ризоктониоза – у 96 % гибридов (таблица 1).

В процессе оценки по развитию и по степени комплексной устойчивости к основным болезням визуально были отмечены следующие гибриды: 3155-16 (Роко × 88.34/14), 3158-3 (Агрия × 88.34/14), 3155-10 (Роко × 88.34/14), 3155-12 (Роко × 88.34/14), 3155-3 (Роко × 88.34/14), 3158-1 (Агрия × 88.34/14). Все эти гибриды объединяла одна общая

отцовская форма – гибрид 88.34/14, характеризующийся высокой устойчивостью к вирусам и хорошей устойчивостью к фитофторе. Все исследуемые сорта проявили высокую и среднюю устойчивость к фитофторе. Возможно, это связано со сложившимися погодными условиями сезона 2023 года в Северной Осетии.

Таблица 1
Визуальная оценка питомника гибридов II года испытания в фазе цветения 2023 г.

№ полевой 2023 г.	Селекционный номер гибрида	Происхождение	Общая оценка по ботве, балл	Вирусные болезни				Черная ножка, шт.	Фитофтороз, балл	Альтернариоз, балл	Ризоктониоз, балл
				Морщинистая мозаика, балл	Крапчатость, балл	Мозаичное закручивание, балл	Скручивание, балл				
II-1	3054-1	4546-1 × Фрителла	5-7	9	9	9	9	9	9	7	9
II-2	3055-1	1610-41 × Фрителла	3-5	7	7	9	9	9	9	9	9
II-3	3150-1	Реал × Акжар	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
II-4	3064-10	4582-2 × Вымпел	5	9	7-9	9	9	9	9	9	9
II-5	3064-2	4582-2 × Вымпел	3-5	5	5	5	9	9	9	9	9
II-6	3155-10	Роко × 88.34/14	5-7	7-9	7-9	9	9	9	9	9	9
II-7	3155-14	Роко × 88.34/14	5-7	7	7-9	9	9	9	9	9	9
II-8	3155-9	Роко × 88.34/14	1-3	5-7	7-9	9	9	9	9	9	5
II-9	3155-16	Роко × 88.34/14	5-7	9	9	9	9	9	9	9	9
II-10	3155-12	Роко × 88.34/14	5-7	7-9	9	9	9	9	9	9	9
II-11	3155-3	Роко × 88.34/14	5-7	7-9	9	9	9	9	9	9	9
II-12	3155-1	Роко × 88.34/14	5-7	7	7	9	9	9	9	9	9
II-13	3155-2	Роко × 88.34/14	5	7	7-9	9	9	9	9	9	9
II-14	3150-2	Реал × Акжар	3	7	7	9	7	9	9	9	9
II-15	3150-5	Реал × Акжар	1	7	9	9	7	9	9	9	9
II-16	3064-8	4582-2 × Вымпел	5-7	7	7-9	9	9	9	7	7	9
II-17	3158-3	Агрия × 88.34/14	5-7	9	9	9	9	9	9	9	9
II-18	3054-8	4546-1 × Фрителла	3-5	7-9	9	9	7	9	9	7	9
II-19	3054-7	4546-1 × Фрителла	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
II-20	3158-1	Агрия × 88.34/14	5-7	9	9	9	9	9	7	9	9
II-21	3064-1	4582-2 × Вымпел	3	7	9	9	7-9	9	9	9	9
II-22	3102-2	Белая ночь × 92.7-26	5	7-9	7-9	9	7	9	9	9	9
II-23	3155-6	Роко × 88.34/14	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
II-24	3054-9	4546-1 × Фрителла	5-7	7-9	9	9	7-9	9	9	7	9
II-25	3054-10	4546-1 × Фрителла	5	7-9	5-	9	9	9	9	9	9
II-26	3054-6	4546-1 × Фрителла	5	7-9	7	9	9	9	7	9	9
II-27	3054-5	4546-1 × Фрителла	3-5	5-7	5	9	9	9	9	9	9
II-28	3046-2	Инноватор × 4560-2	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
II-29	3046-5	Инноватор × 4560-2	3	7	7-9	9	5-7	9	9	9	9
II-30	3046-6	Инноватор × 4560-2	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
II-31	3054-4	4546-1 × Фрителла	1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Table 1

Visual assessment of the nursery of hybrids of the II year of the trial in the flowering phase 2023

No. field 2023	Hybrid selection number	Origin	Total score for haulm, score	Viral diseases				Black foot pcs.	Phytophthora score	Alternariasis, score	Rhizoctoniosis, score
				Wrinkled mosaic, score	Mottling, score	Mosaic twist, score	Torsion, score				
II-1	3054-1	4546-1 × Fritella	5–7	9	9	9	9	9	9	7	9
II-2	3055-1	1610-41 × Fritella	3–5	7	7	9	9	9	9	9	9
II-3	3150-1	Real × Akzhar	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found
II-4	3064-10	4582-2 × Vympel	5	9	7–9	9	9	9	9	9	9
II-5	3064-2	4582-2 × Vympel	3–5	5	5	5	9	9	9	9	9
II-6	3155-10	Roko × 88.34/14	5–7	7–9	7–9	9	9	9	9	9	9
II-7	3155-14	Roko × 88.34/14	5–7	7	7–9	9	9	9	9	9	9
II-8	3155-9	Roko × 88.34/14	1–3	5–7	7–9	9	9	9	9	9	5
II-9	3155-16	Roko × 88.34/14	5–7	9	9	9	9	9	9	9	9
II-10	3155-12	Roko × 88.34/14	5–7	7–9	9	9	9	9	9	9	9
II-11	3155-3	Roko × 88.34/14	5–7	7–9	9	9	9	9	9	9	9
II-12	3155-1	Roko × 88.34/14	5–7	7	7	9	9	9	9	9	9
II-13	3155-2	Roko × 88.34/14	5	7	7–9	9	9	9	9	9	9
II-14	3150-2	Real × Akzhar	3	7	7	9	7	9	9	9	9
II-15	3150-5	Real × Akzhar	1	7	9	9	7	9	9	9	9
II-16	3064-8	4582-2 × Vympel	5–7	7	7–9	9	9	9	7	7	9
II-17	3158-3	Agriya × 88.34/14	5–7	9	9	9	9	9	9	9	9
II-18	3054-8	4546 × Fritella	3–5	7–9	9	9	7	9	9	7	9
II-19	3054-7	4546-1 × Fritella	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found
II-20	3158-1	Agriya × 88.34/14	5–7	9	9	9	9	9	7	9	9
II-21	3064-1	4582-2 × Vympel	3	7	9	9	7–9	9	9	9	9
II-22	3102-2	Belaya Noch' × 92.7-26	5	7–9	7–9	9	7	9	9	9	9
II-23	3155-6	Roko × 88.34/14	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found
II-24	3054-9	4546-1 × Fritella	5–7	7–9	9	9	7–9	9	9	7	9
II-25	3054-10	4546-1 × Fritella	5	7–9	5–7	9	9	9	9	9	9
II-26	3054-6	4546-1 × Fritella	5	7–9	7	9	9	9	7	9	9
II-27	3054-5	4546-1 × Fritella	3–5	5–7	5	9	9	9	9	9	9
II-28	3046-2	Innovator × 4560-2	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found
II-29	3046-5	Innovator × 4560-2	3	7	7–9	9	5–7	9	9	9	9
II-30	3046-6	Innovator × 4560-2	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found
II-31	3054-4	4546-1 × Fritella	1	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found	not found

Образцы картофеля питомника II года, собранные в фазу цветения во время визуальной оценки гибридов, были продиагностированы на наличие X- и Y-вирусов картофеля и других заболеваний с помощью метода диагностики ПЦР-РВ. По резуль-

татам ПЦР-анализа в исследуемых гибридах не обнаружены нуклеиновые кислоты вируса картофеля X (PVX), вирида веретеновидности клубней картофеля (Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd)), черной ножки (*Dickea spp.*) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis ssp*) (таблица 2).

Таблица 2

ПЦР-диагностика фитопатогенов картофеля II года испытания (2023 год)

Агротехнологии

№ п/п	Селекционный номер гибрида	Происхождение	PVX, цикл	PVY, цикл	PSTVd (вирионид веретенивидности клубней картофеля), цикл	Clavibacter michiganensis ssp. (кольцевая гниль), цикл	Dickeya spp. (черная ножка), цикл
1	3054-1	4546-1 × Фрителла	–	–	–	–	–
2	3055-1	1610-41 × Фрителла	–	–	–	–	–
3	3150-1	Реал × Акжар	–	–	–	–	–
4	3064-10	4582-2 × Вымпел	–	36,65	–	–	–
5	3064-2	4582-2 × Вымпел	–	21,1	–	–	–
6	3155-10	Роко × 88.34/14	–	34,39	–	–	–
7	3155-14	Роко × 88.34/14	–	–	–	–	–
8	3155-9	Роко × 88.34/14	–	36,23	–	–	–
9	3155-16	Роко × 88.34/14	–	–	–	–	–
10	3155-12	Роко × 88.34/14	–	36,48	–	–	–
11	3155-3	Роко × 88.34/14	–	36,53	–	–	–
12	3155-1	Роко × 88.34/14	–	–	–	–	–
13	3155-2	Роко × 88.34/14	–	37,27	–	–	–
14	3150-2	Реал × Акжар	–	35,66	–	–	–
15	3150-5	Реал × Акжар	–	–	–	–	–
16	3064-8	4582-2 × Вымпел	–	37,75	–	–	–
17	3158-3	Агрива × 88.34/14	–	36,01	–	–	–
18	3054-8	4546 × Фрителла	–	36,73	–	–	–
19	3054-7	4546-1 × Фрителла	–	36,47	–	–	–
20	3158-1	Агрива × 88.34/14	–	37,86	–	–	–
21	3064-1	4582-2 × Вымпел	–	36,1	–	–	–
22	3102-2	Белая ночь × 92.7-26	–	–	–	–	–
23	3155-6	Роко × 88.34/14	–	23,62	–	–	–
24	3054-9	4546-1 × Фрителла	–	35,28	–	–	–
25	3054-10	4546-1 × Фрителла	–	20,07	–	–	–
26	3054-6	4546-1 × Фрителла	–	–	–	–	–
27	3054-5	4546-1 × Фрителла	–	21,22	–	–	–
28	3046-2	Инноватор × 4560-2	–	23,57	–	–	–
29	3046-5	Инноватор × 4560-2	–	–	–	–	–
30	3046-6	Инноватор × 4560-2	–	34,94	–	–	–
31	3054-4	4546-1 × Фрителла	–	35,37	–	–	–
32	ПКО1	–	31,51	33,42	29,24	33,24	30,10
33	ОКО1	–	–	–	–	–	–

Table 2

PCR diagnosis of potato phytopathogens year of the trial (2023)

No.	Selection number of hybrid	Origin	PVX, cycle	PVY, cycle	PSTVd, cycle	Clavibacter michiganensis ssp., cycle	Dickeya spp., cycle
1	3054-1	4546-1 × Fritella	–	–	–	–	–
2	3055-1	1610-41 × Fritella	–	–	–	–	–
3	3150-1	Real × Akzhar	–	–	–	–	–
4	3064-10	4582-2 × Vympel	–	36.65	–	–	–
5	3064-2	4582-2 × Vympel	–	21.1	–	–	–
6	3155-10	Roko × 88.34/14	–	34.39	–	–	–
7	3155-14	Roko × 88.34/14	–	–	–	–	–
8	3155-9	Roko × 88.34/14	–	36.23	–	–	–

9	3155-16	Roko × 88.34/14	–	–	–	–	–
10	3155-12	Roko × 88.34/14	–	36.48	–	–	–
11	3155-3	Roko × 88.34/14	–	36.53	–	–	–
12	3155-1	Roko × 88.34/14	–	–	–	–	–
13	3155-2	Roko × 88.34/14	–	37.27	–	–	–
14	3150-2	Real × Akzhar	–	35.66	–	–	–
15	3150-5	Real × Akzhar	–	–	–	–	–
16	3064-8	4582-2 × Vympel	–	37.75	–	–	–
17	3158-3	Agriya × 88.34/14	–	36.01	–	–	–
18	3054-8	4546 × Fritella	–	36.73	–	–	–
19	3054-7	4546-1 × Fritella	–	36.47	–	–	–
20	3158-1	Agriya × 88.34/14	–	37.86	–	–	–
21	3064-1	4582-2 × Vympel	–	36.1	–	–	–
22	3102-2	Belaya Noch' × 92.7-26	–	–	–	–	–
23	3155-6	Roko × 88.34/14	–	23.62	–	–	–
24	3054-9	4546-1 × Fritella	–	35.28	–	–	–
25	3054-10	4546-1 × Fritella	–	20.07	–	–	–
26	3054-6	4546-1 × Fritella	–	–	–	–	–
27	3054-5	4546-1 × Fritella	–	21.22	–	–	–
28	3046-2	Innovator × 4560-2	–	23.57	–	–	–
29	3046-5	Innovator × 4560-2	–	–	–	–	–
30	3046-6	Innovator × 4560-2	–	34.94	–	–	–
31	3054-4	4546-1 × Fritella	–	35.37	–	–	–
32	PKO 1	–	31.51	33.42	29.24	33.24	30.10
33	OKO 1	–	–	–	–	–	–

Однако в ходе анализа Y-вирус картофеля (PVY) обнаружен в 21 пробе картофеля. Прослеживается корреляция между высоким содержанием вирусных частиц Y-вируса, проявившихся до 30 цикла при реакции ПРЦ-РТ, в тканях образцов и визуальным проявлением вирусного начала в виде отставания в развитии растений или проявлением симптомов на ботве.

В целом факт наличия вирусной инфекции уже на второй год испытаний гибридов картофеля в поле, а также результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о высоком инфекционном фоне вируса PVY и широком распространении насекомых-переносчиков в условиях агроценозов лесостепной зоны РСО-Алания.

Молекулярно-генетических анализ на наличие генов устойчивости среди гибридов картофеля может существенно повысить эффективность и точность отбора при использовании ДНК-маркеров. С этой целью среди 31 гибрида картофеля из питомника испытания II года был проведен молекулярный скрининг на наличие маркеров генов устойчивости к патогенам.

Для оценки устойчивости к золотистой и бледной картофельной нематод наиболее эффективным считается применение маркеров генов *H1*, *Gro1-4* и *Gpa2*. В результате молекулярно-генети-

ческого анализа установлено, что ген устойчивости к *G. rostochiensis* (*H1*) – маркер *TG 689* – выявлен у 15 генотипов картофеля (таблица 3).

Идентификация в селекционном материале картофеля доминантного аллеля гена *Gro 1-4*, контролирующего устойчивость к пяти патогенам (*Rol-Ro5*) *G. rostochiensis*, выявила, что носителями являются 2 гибрида картофеля – 3155-9 и 3155-12 (Роко × 88.34/14), в родословной которого указан *S. spegazzinii* Bitter, являющийся источником гена *Gro1-4*.

Маркер доминантного гена *Gpa 2*, контролирующей устойчивость к *G. pallida*, идентифицирован в трех гибридах: 3055-1 (1610-41 × Фрителла); 3064 (4582-2 × Вымпел); 3150-5 (Реал × Акжар).

Среди исследуемых образцов картофеля STS-маркер YES3-3A гена *Ry_{sto}*, контролирующей устойчивость к вирусу Y, обнаружен в 6 гибридных образцах картофеля 3055-1 (1610-41 × Фрителла), 3155-16 (Роко × 88.34/14), 3064-8 (4582-2 × Вымпел), 3054-7 (4546-1 × Фрителла), 3064-1 (4582-2 × Вымпел), 3046-2 (Иноватор × 4560-2). Маркер RYSC3 гена *Ry_{adg}* не обнаружен ни в одном образце. Маркер гена устойчивости к PVX – *Rx1* – выявлен у одного генотипа картофеля 3064-10 (4582-2 × Вымпел).

Таблица 3

Скрининг генетических маркеров генов устойчивости в генотипах питомника гибридов II года испытания (2023 год)

Агротехнологии

№ п/п	Селекционный номер гибрида	Происхождение	Наличие ДНК маркеров (маркер/ген)						Общее количество генов, шт.
			TG 689 / ген HI	Gro1-4-1 / ген Gro1-4	Gpa 2-2 / ген Gpa 2	YES3-3A / ген Ry _{so}	RYSC3 / ген Ry _{adg}	PVX / ген Rx1	
			G. <i>rostochiensis</i>	G. <i>pallida</i>	PVY		PVX		
1	3054-1	4546-1 × Фрителла	1	0	0	0	0	0	1
2	3055-1	1610-41 × Фрителла	1	0	1	1	0	0	3
3	3150-1	Реал × Акжар	0	0	0	0	0	0	0
4	3064-10	4582-2 × Вымпел	0	0	1	0	0	1	1
5	3064-2	4582-2 × Вымпел	1	0	0	0	0	0	1
6	3155-10	Роко × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
7	3155-14	Роко × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
8	3155-9	Роко × 88.34/14	1	1	0	0	0	0	2
9	3155-16	Роко × 88.34/14	1	0	0	1	0	0	2
10	3155-12	Роко × 88.34/14	1	1	0	0	0	0	2
11	3155-3	Роко × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
12	3155-1	Роко × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
13	3155-2	Роко × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
14	3150-2	Реал × Акжар	0	0	0	0	0	0	0
15	3150-5	Реал × Акжар	0	0	1	0	0	0	1
16	3064-8	4582-2 × Вымпел	1	0	0	1	0	0	2
17	3158-3	Агрива × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
18	3054-8	4546 × Фрителла	0	0	0	0	0	0	0
19	3054-7	4546-1 × Фрителла	0	0	0	1	0	0	1
20	3158-1	Агрива × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
21	3064-1	4582-2 × Вымпел	1	0	0	1	0	0	2
22	3102-2	Белая ночь × 92.7-26	0	0	0	0	0	0	0
23	3155-6	Роко × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
24	3054-9	4546-1 × Фрителла	0	0	0	0	0	0	0
25	3054-10	4546-1 × Фрителла	0	0	0	0	0	0	0
26	3054-6	4546-1 × Фрителла	1	0	0	0	0	0	1
27	3054-5	4546-1 × Фрителла	1	0	0	0	0	0	1
28	3046-2	Инноватор × 4560-2	1	0	0	1	0	0	2
29	3046-5	Инноватор × 4560-2	0	0	0	0	0	0	0
30	3046-6	Инноватор × 4560-2	1	0	0	0	0	0	1
31	3054-4	4546-1 × Фрителла	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. 1 – маркер присутствует; 0 – маркер отсутствует.

Table 3

Screening of genetic markers of resistance genes in genotypes of nursery hybrids of year II of the trial (2023)

No.	Selection number of hybrid	Origin	Presence of DNA markers (marker/gene)						Total number of genes, pcs.
			TG 689 / gene HI	Gro1-4-1 / gene Gro1-4	Gpa 2-2 / gene Gpa 2	YES3-3A / gene Ry _{so}	RYSC3 / gene Ry _{adg}	PVX / gene Rx1	
			G. <i>rostochiensis</i>	G. <i>pallida</i>	PVY		PVX		
1	3054-1	4546-1 × Fritella	1	0	0	0	0	0	1
2	3055-1	1610-41 × Fritella	1	0	1	1	0	0	3

3	3150-1	Real × Akzhar	0	0	0	0	0	0	0
4	3064-10	4582-2 × Vympel	0	0	1	0	0	1	1
5	3064-2	4582-2 × Vympel	1	0	0	0	0	0	1
6	3155-10	Roko × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
7	3155-14	Roko × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
8	3155-9	Roko × 88.34/14	1	1	0	0	0	0	2
9	3155-16	Roko × 88.34/14	1	0	0	1	0	0	2
10	3155-12	Roko × 88.34/14	1	1	0	0	0	0	2
11	3155-3	Roko × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
12	3155-1	Roko × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
13	3155-2	Roko × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
14	3150-2	Real × Akzhar	0	0	0	0	0	0	0
15	3150-5	Real × Akzhar	0	0	1	0	0	0	1
16	3064-8	4582-2 × Vympel	1	0	0	1	0	0	2
17	3158-3	Agria × 88.34/14	1	0	0	0	0	0	1
18	3054-8	4546 × Fritella	0	0	0	0	0	0	0
19	3054-7	4546-1 × Fritella	0	0	0	1	0	0	1
20	3158-1	Agria × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
21	3064-1	4582-2 × Vympel	1	0	0	1	0	0	2
22	3102-2	Belaya Noch' × 92.7-26	0	0	0	0	0	0	0
23	3155-6	Roko × 88.34/14	0	0	0	0	0	0	0
24	3054-9	4546-1 × Fritella	0	0	0	0	0	0	0
25	3054-10	4546-1 × Fritella	0	0	0	0	0	0	0
26	3054-6	4546-1 × Fritella	1	0	0	0	0	0	1
27	3054-5	4546-1 × Fritella	1	0	0	0	0	0	1
28	3046-2	Innovator × 4560-2	1	0	0	1	0	0	2
29	3046-5	Innovator × 4560-2	0	0	0	0	0	0	0
30	3046-6	Innovator × 4560-2	1	0	0	0	0	0	1
31	3054-4	4546-1 × Fritella	0	0	0	0	0	0	0

Note. 1 – marker present; 0 – marker absent.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Таким образом, выявление фитопатогенов картофеля с использованием различных методов является важным этапом борьбы с заболеваниями растений. Благодаря современным технологиям и методам молекулярной диагностики возможно достичь высокой точности и эффективности в определении патогенов, что способствует сохранению качественного картофельного урожая. Результаты молекулярного анализа на наличие маркеров генов устойчивости к патогенам можно рассматривать в качестве одного из основных критериев при состав-

лении программ по гибридизации картофеля. Таким образом, использование молекулярных маркеров позволяет определить наличие генов устойчивости и оценить перспективность образца за короткий промежуток времени для дальнейшей гибридизации. В процессе ДНК-маркирования выделены перспективные гибриды картофеля, обладающие устойчивостью к золотистой цистообразующей картофельной нематоде, – 15 гибридов; к бледной картофельной нематоде – 3 генотипа; к PVY-вирусу картофеля – 6 гибридов; к PVX-вирусу картофеля – 1 гибрид.

Библиографический список

1. Анисимов Б. В., Симаков Е. А., Жевора С. В. [и др.] Диагностика и профилактика вирусных, бактериальных и грибных болезней, контролируемых в семеноводстве картофеля. Методические рекомендации. Владикавказ: ИР, 2021. 62 с.
2. Barkov V. A., Belov D. A., Zeiruk V. N., et al. Strategy of potato chemical protection from diseases. // BIO Web of Conferences. International Scientific and Practical Conference “Innovative Technologies in Agriculture” (ITIA 2022). Oryol, 2022. DOI: 10.1051/bioconf/20224705001.

3. Carillo P., Colla G., El-Nakhel C., et al. Biostimulant Application with a Tropical Plant Extract Enhances *Corchorus olitorius* Adaptation to SubOptimal Nutrient Regimens by Improving Physiological Parameters // *Agronomy*. 2019. No. 9. Pp. 249–258. DOI: 10.3390/agronomy9050249.
4. Сердеров В. К., Караев М. К., Атамов Б. К. Возделывание сортов картофеля для промышленной переработки // *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. 2020. № 3. С. 59–61. DOI: 10.30850/vrnsn/2020/3/59-61
5. Половникова В. В. Биологические особенности возбудителей болезней картофеля и меры борьбы с ними в условиях Курганской области // *Вестник Курганской ГСХА*. 2019. № 2 (30). С. 23–29.
6. Gupta P., Salava H., Sreelakshmi Y., Sharma R. A low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation // *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, 2020. Vol. 2072. Pp. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1.
7. Калашников А. Е., Кабицкая Я. А. ПЦР-диагностика возбудителей болезней сортов картофеля (*Solanum tuberosum*) // *Известия Кабардино-Балкарского государственного аграрного университета им. В. М. Кокова*. 2022. № 2 (36). С. 5–14. DOI: 10.55196/2411-3492-2022-2-36-5-14.
8. Zlobin I. E., Pashkovskiy P. P., Kartashov A. V., et al. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells // *Environmental and Experimental Botany*. 2020. Vol. 176. Article number 104104. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.1041049.
9. De Keyser E., Desmet L., Losschaert M., De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants // *Quantitative Real-Time PCR. Methods in Molecular Biology*, 2020. Vol. 2065. DOI: 10.1007/978-1-4939-9833-3_9.
10. Рыбаков Д. А., Антонова О. Ю., Чухина И. Г. [и др.] Номенклатурные стандарты и генетические паспорта сортов картофеля селекции Всероссийского научно-исследовательского института картофеля им. А. Г. Лорха // *Биотехнология и селекция растений*. 2020. Т. 3, № 4. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-01.
11. Зотеева Н. М., Антонова О. Ю., Клименко Н. С., Гавриленко Т. А. Маркеры генов устойчивости к фитофторозу, Y вирусу картофеля и золотистой картофельной нематоде у перспективных клонов межвидовых гибридов картофеля // *Биотехнология и селекция растений*. 2022. Т. 5, № 1. С. 5–16. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-1-01.
12. Бирюкова В. А., Шмыгля И. В., Жарова В. А. [и др.] Молекулярные маркеры генов экстремальной устойчивости к Y вирусу картофеля в сортах и гибридах *Solanum tuberosum* L. // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2019. Т. 5. С. 17–22. DOI: 10.31857/S2500-26272019517-22.
13. Шестеперов А. А., Грибоедова О. Г. Создание нематодоустойчивых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур // *Аграрная наука*. 2019. Т. S2. С. 130–134. DOI: 10.32634/0869-8155-2019-326-2-130-134.
14. Prodhomme C., Vos P., Paulo M. J., et al. Distribution of P1(D1) wart disease resistance in potato germplasm and GWAS identification of haplotype-specific SNP markers // *Theoretical and Applied Genetics*. 2020. Vol. 133. Pp. 1859–1871. DOI: 10.1007/s00122-020-03559-3.
15. Bhardwaj V., Sood S., Kumar A., et al. Efficiency and reliability of marker assisted selection for resistance to major biotic stresses in potato // *Potato Journal*. 2019. Vol. 46, No. 1. Pp. 56–66.
16. Trayanov K., Samaliev H., Kostova M., et al. Morphological and molecular identification of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in Bulgaria // *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2020. Vol. 26, No. 2. Pp. 416–422.
17. Клименко Н. С. Поиск источников устойчивости к *Globodera pallida* и к PVX в коллекции отечественных сортов картофеля с использованием молекулярных маркеров // *Биотехнология и селекция растений*. 2019. Т. 2, № 1. С. 42–48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48.

Об авторах:

Андрей Робертович Пухаев, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных растений, Федеральный научный центр «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, Россия; ORCID 0009-0008-3040-0589, AuthorID 1045945. *E-mail: puhaev80@yandex.ru*

Ирина Олеговна Газданова, кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований сельскохозяйственных растений, Федеральный научный центр «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, Россия; ORCID 0000-0002-3000-8615, AuthorID 1036581. *E-mail: Gazdanovaira2020@gmail.com*

References

1. Anisimov B. V., Simakov E. A., Zhevora S. V., et al. Diagnosis and prevention of viral, bacterial and fungal diseases controlled in potato seed production: methodical recommendations. Vladikavkaz: IR, 2021. 62 p. (In Russ.)

2. Barkov V. A., Belov D. A., Zeyruk V. N., et al. Strategy of potato chemical protection from diseases. *BIO Web of Conferences. International Scientific and Practical Conference "Innovative Technologies in Agriculture (ITIA 2022)*. Oryol, 2022: 05001. DOI: 10.1051/bioconf/20224705001.
3. Carillo P., Colla G., El-Nakhel C., et al. Biostimulant Application with a Tropical Plant Extract Enhances *Corchorus olitorius* Adaptation to SubOptimal Nutrient Regimens by Improving Physiological Parameters. *Agronomy*. 2019; 9: 249–258. DOI: 10.3390/agronomy9050249.
4. Serderov V. K., Karaev M. K., Atamov B. K. Potatoes varieties cultivation for industrial processing. *Vestnik of the Russian Agricultural Science*. 2020; 3: 59–61. DOI: 10.30850/vrsn/2020/3/59-61. (In Russ.)
5. Polovnikova V. V. Biological features of potato disease pathogens and measures to combat them in the conditions of the Kurgan region. *Bulletin of Kurgan State Agricultural Academy*. 2019. 2 (30). 23–29. (In Russ.)
6. Gupta P., Salava H., Sreelakshmi Y., Sharma R. A low-cost high-throughput method for plant genomic DNA isolation. *Cereal Genomics. Methods in Molecular Biology*. Humana, New York, 2020. Vol. 2072. PP. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4939-9865-4_1
7. Kalashnikov A. E., Kabitskaya Ya. A. PCR diagnostics of pathogens of potato varieties (*Solanum tuberosum*). *Izvestiya Kabardino-Balkarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta im. V. M. Kokova*. 2022; 2 (36): 5–14. DOI: 10.55196/2411-3492-2022-2-36-5-14. (In Russ.)
8. Zlobin I. E., Pashkovskiy P. P., Kartashov A. V., et al. The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells. *Environmental and Experimental Botany*. 2020; 176: 104104. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.1041049.
9. De Keyser E., Desmet L., Losschaert M., De Riek J. A General protocol for accurate gene expression analysis in plants Quantitative Real-Time PCR. *Methods in Molecular Biology*. 2020; 2065. DOI: 10.1007/978-1-4939-9833-3_9.
10. Rybakov D. A., Antonova O. Yu., Chukhina I. G., et al. Nomenclatural standards and genetic passports of potato cultivars bred in the A. G. Lorkh All-Russian Potato Research Institute of Potato Farming. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020; 3 (4). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o1. (In Russ.)
11. Zoteeva N. M., Antonova O. Yu., Klimenko N. S., Gavrilenko T. A. Markers of genes of resistance to phytophthorosis, potato virus Y and golden potato nematode in promising clones of interspecific potato hybrids. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2022; 5 (1): 5–16. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-1-o1. (In Russ.)
12. Biryukova V. A., Shmyglya I. V., Zharova V. A., et al. Molecular markers of genes for extreme resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* L. cultivars and hybrids. *Russian Agricultural Sciences*. 2019; 5: 17–22. (In Russ.)
13. Shesteporov A. A., Griboedova O. G. The creation of nematode resistant varieties and hybrids of agricultural crops. *Agrarian Science*. 2019; S2: 130–134. DOI: 10.32634/0869-8155-2019-326-2-130-134. (In Russ.)
14. Prodhomme C., Vos P., Paulo M. J., et al. Distribution of P1(D1) wart disease resistance in potato germplasm and GWAS identification of haplotype-specific SNP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2020; 133: 1859–1871. DOI: 10.1007/s00122-020-03559-3.
15. Bhardwaj V., Sood S., Kumar A., et al. Efficiency and reliability of marker assisted selection for resistance to major biotic stresses in potato. *Potato Journal*. 2019; 46 (1): 56–66.
16. Trayanov K., Samaliev H., Kostova M., et al. Morphological and molecular identification of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2020; 26 (2): 416–422.
17. Klimenko N. S. Search for resistance sources to *Globodera pallida* and potato virus X in the collection of potato varieties using molecular markers. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019; 2 (1): 42–48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-42-48. (In Russ.)

Authors' information:

Andrey R. Pukhaev, candidate of biological sciences, researcher at the laboratory of molecular genetic research of agricultural plants, Federal Scientific Center "Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Vladikavkaz, Russia; ORCID 0009-0008-3040-0589, AuthorID 1045945. *E-mail: puhaev80@yandex.ru*

Irina O. Gazdanova, candidate of agricultural sciences, researcher at the laboratory of molecular genetic research of agricultural plants, Federal Scientific Center "Vladikavkaz Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", Vladikavkaz, Russia; ORCID 0000-0002-3000-8615, AuthorID 1036581. *E-mail: Gazdanovaira2020@gmail.com*