

**Картофелеводство: наука и технологии**

УДК 635.21:632.3.01/.08:57.08

doi: 10.15389/agrobiologia.2018.1.111rus

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ И КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ЧЕРНОЙ НОЖКИ И МЯГКОЙ ГНИЛИ КЛУБНЕЙ**  
(обзор)**Н.В. СТАЦЮК, М.А. КУЗНЕЦОВА**

Одни из наиболее вредоносных заболеваний картофеля — так называемая черная ножка и связанная с ней мягкая гниль клубней, вызываемые бактериями *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* и *Dickeya* spp. Ежегодные потери урожая от этих болезней составляют 10-15 %, а в эпифитотийные годы могут превышать 50 %. В настоящее время ни один из коммерческих сортов картофеля не обладает высокой устойчивостью по отношению к этим бактериозам, поскольку в большинстве существующих программ селекции признак ранее не относился к приоритетным. В последние годы во всех странах мира, включая Россию, потери картофеля, связанные с черной ножкой и мягкой гнилью, существенно возросли, что увеличивает востребованность устойчивых к бактериозам сортов картофеля, а также эффективных методик оценки устойчивости исходного материала, новых сортов и гибридов. Слабая корреляция между степенью устойчивости картофеля к черной ножке и мягкой гнили клубней приводит к необходимости параллельной оценки по каждому из этих признаков (R. Czajkowski с соавт., 2011). Выбор наиболее предпочтительного метода лабораторной оценки зависит от целей исследователя, а также доступности биологического материала, оборудования и помещений. В представленном обзоре подобно рассмотрены достоинства и недостатки известных методик, а также перечислены факторы и условия проведения тестирования, способные повлиять на их конечные результаты. В условиях крупных селекционных центров оценка устойчивости растений к черной ножке может быть выполнена *in vitro* на эксплантах. Эта методика надежна и обеспечивает быстрое и масштабное воспроизводство устойчивых генотипов (I. Hudák с соавт., 2006). При необходимости сохранить растение для других исследований используется метод отделенных листьев (A. Sima с соавт., 2015). Такой вариант лабораторной оценки обеспечивает результаты, хорошо согласующиеся с данными полевых оценок устойчивости и подходит для массового скрининга доноров устойчивости среди дикорастущих видов *Solanum* или трансгенных растений. Селекционеры, работающие с ботаническими семенами картофеля, а также микро-, мини- и обычными клубнями, применяют метод оценки устойчивости в контролируемых условиях (V.S. Bisht с соавт., 1993). Оценка устойчивости клубней к мягкой бактериальной гнили может быть выполнена методами вакуумной инфильтрации (M. Koppel, 1993), а также инокуляции в анаэробных (R.A. Vain с соавт., 1988) и аэробных (I. Hudák с соавт., 2009) условиях. Исследования проводятся как на целых клубнях, так и на высечках и ломтиках. В последнем случае продолжительность эксперимента заметно снижается (K.S. Tzeng с соавт., 1990). В качестве критерия оценки используют размер некроза тканей в месте инокуляции, массу или объем пораженных тканей, отношение массы здоровых и пораженных тканей или площади пораженной поверхности к поверхности всего клубня. Следует учитывать, что сравнение результатов, полученных разными методами, может оказаться некорректным. Планирование и проведение экспериментов по оценке клубней на устойчивость к мягкой гнили требует стандартизации ряда факторов, влияющих на конечные результаты; несоблюдение этого условия сделает невозможным объективное сравнение полученных результатов. Среди факторов следует упомянуть видовую принадлежность инокулома, температуру тканей клубня и бактериальной суспензии в момент инокулирования, температуру инкубации после инокулирования, а также точку инокуляции или место, откуда была сделана высечка. В отношении оценки устойчивости растений к проявлению симптомов черной ножки исследования таких факторов практически не проводились.

**Ключевые слова:** картофель, бактериозы, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya* spp., оценка устойчивости, черная ножка, мягкая гниль клубней.

Современные сорта культурных растений обладают высоким генетическим потенциалом продуктивности, однако в производственных условиях реализуют его всего на 30-50 % (1, 2). Одна из главных причин — болезни, вызываемые фитопатогенными микроорганизмами. В связи с этим важное место в селекции растений занимает оценка устойчивости к инфекционным болезням исходного материала и созданных на его основе сортов и гибридов. Она объективно показывает их селекционную ценность

и возможность применения в различных регионах России. Информация о методах оценки необходима для успешной работы исследователей, занимающихся селекцией новых сортов или регистрационными испытаниями.

Целью настоящей статьи стал обзор зарубежных публикаций по методикам оценки устойчивости картофеля к бактериальным болезням, вызываемым *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* и *Dickeya* spp. Его актуальность связана с возросшей в последние годы экономической значимостью этих патогенов, а также с практически полным отсутствием русскоязычных публикаций по этой тематике.

Картофель — одна из важнейших сельскохозяйственных культур в Российской Федерации, однако его продуктивность в условиях РФ остается довольно низкой (15-20 т/га) (3). Болезни картофеля, связанные с фитопатогенными бактериями, занимают второе место после фитофтороза по экономической значимости (4). В отличие от вирусов, бактериальная инфекция способна сохраняться даже при производстве меристемных растений *in vitro*, ухудшая качество семенного материала и снижая урожай (5). Бактериальные поражения вызывают ослабление и гибель растений в период роста, загнивание клубней в почве и во время хранения. Ежегодные потери урожая от бактериозов составляют 10-15 %, а в годы, когда развитие бактериальных болезней носит характер эпифитотий, могут превышать 50 % (6). В последнее время во всех странах мира потери картофеля от бактериозов существенно возросли. Это связано с климатическими изменениями, благоприятствующими размножению фитопатогенной бактериальной флоры и появлению новых вредоносных бактерий, повсеместным внедрением механизированной уборки картофеля, увеличивающей вероятность повреждения клубней, и отсутствием своевременной и точной диагностики бактериозов (7).

Одними из наиболее вредоносных бактериальных заболеваний картофеля считаются так называемая черная ножка и связанная с ней мягкая гниль клубней. Поражение подземных частей столонов в начале вегетационного периода приводит к замедлению роста и постепенному отмиранию ботвы, а развитие инфекции в середине вегетации проявляется в виде почернения и некроза прикорневой части стеблей, сопровождающегося увяданием и пожелтением листьев (8). Пораженные стебли, как правило, отмирают до полного созревания клубней, что негативно сказывается на качестве урожая. Клубни, собранные с пораженных растений, часто оказываются инфицированными возбудителем заболевания, что приводит к развитию на них симптомов мягкой гнили во время вегетационного сезона или в процессе хранения. Инфицирование клубней может происходить через пораженные столоны или через чечевички при попадании бактерий с пораженного материнского клубня в корневую зону (8).

К возбудителям черной ножки картофеля относятся несколько самостоятельных, но близкородственных видов пектолитических бактерий, первоначально носивших названия *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* и *E. chrysanthemi*. Однако на основании результатов филогенетического анализа с использованием нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, было предложено выделить эти и еще некоторые виды *Erwinia* в отдельный род *Pectobacterium* с изменением названий соответственно на *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* и *P. chrysanthemi* (9). Впоследствии *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* был выделен в отдельный вид *P. atrosepticum* (10), а *P. chrysanthemi* отнесен к новому роду *Dickeya* (11).

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* и *P. atrosepticum* — известные и широко распространенные патогены картофеля. Бактерии рода *Dickeya* бы-

ли впервые идентифицированы как возбудители стеблевой гнили картофеля в Нидерландах в начале 1970-х годов (8). Примерно в то же время появилась информация об идентификации бактерий, относящихся к этому роду, как возбудителей черной ножки картофеля в Японии и мягкой гнили клубней в Австралии (12, 13). Затем появились сообщения о связи *Dikeya* spp. с вышеупомянутыми болезнями картофеля во Франции, Израиле и Южной Африке (14-16). С 2004 года *Dikeya* spp. начала стремительно распространяться по территории Европы, что связывают с увеличением частоты жарких весенне-летних сезонов в северных регионах, а также появлением нового биовара патогена — *D. solani* (17-19). В последние годы этот фитопатоген стал серьезной проблемой для всей Европы (20-23), а также стран, импортирующих из нее семенной картофель (24-26). В настоящее время бактерии *D. dianthicola* включены Европейской и Средиземноморской организацией по карантину и защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) в список A2 организмов, рекомендованных для регулирования как карантинные фитопатогены с ограниченным распространением на территории стран-членов EPPO (17). В России фитопатогенные бактерии рода *Dikeya* spp. были впервые обнаружены в 2009 году (27).

Сорта картофеля, обладающие полным иммунитетом к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней, в природе отсутствуют, но некоторые сорта, а также дикорастущие виды картофеля проявляют частичную устойчивость (28, 29). В настоящее время ни один из коммерческих сортов картофеля не обладает высокой устойчивостью, поскольку в большинстве существующих программ селекции этот признак ранее не относился к приоритетным (30). Устойчивость растений к проявлению симптомов черной ножки и устойчивость клубней тех же сортов или гибридов к мягкой клубневой гнили далеко не всегда коррелируют между собой. Это осложняет селекцию на устойчивость, поскольку возникает необходимость оценки по каждому из признаков (31-34; J. Dobránszki, персональное сообщение).

Как правило, полевые тесты на устойчивость более трудоемкие и сложные, поэтому значительное внимание уделяется разработке удобных и быстрых лабораторных методик. К настоящему времени стандарты для таких методик отсутствуют, хотя в большинстве из них используется одинаковая концентрация инокулюма —  $1 \times 10^8$ - $2 \times 10^8$  КОЕ/мл, и лишь в нескольких вариантах она существенно отличается от этой величины. Существующие методы различаются в зависимости от объекта, техники проведения, используемой шкалы оценки и могут быть разделены на несколько групп.

Оценка устойчивости картофеля к черной ножке в условиях *in vitro* с применением эксплантов. При использовании этой методики искусственно заражают выращенные на питательной среде экспланты. Возраст растений и методы заражения могут различаться. Использование эксплантов, свободных от вирусных и грибных патогенов, исключает возможные вариации чувствительности к возбудителю черной ножки, связанные с инфицированием.

В исследованиях I. Hudák с соавт. (35, 36) использовали растения картофеля разных сортов, выращенные на среде Мурасиге-Скуга (MS), не содержащей гормонов, в контролируемых условиях при температуре 20-22 °C и 16-часовом фотопериоде. В возрасте 3 нед стебли растений инокулировали при помощи пинцета, смоченного бактериальной суспензией *E. chrysanthemi* или стерильной дистиллированной водой (контроль). Спустя 1 нед после инокуляции оценивали развитие симптомов заболевания. В зависимости от степени выраженности болезни растения разделяли на пять групп (35): 1 — отсутствие симптомов болезни; 2 — 1-25 % увядших листь-

ев; 3 — 26-50 % увядших листьев; 4 — 51-75 % увядших листьев; 5 — 76-100 % увядших листьев.

Для каждого сорта рассчитывали индекс инфекции  $F_i$  по формуле:

$$F_i = \frac{\sum[(N_1 \cdot 1) + (N_2 \cdot 2) + (N_3 \cdot 3) + (N_4 \cdot 4) + (N_5 \cdot 5)]}{\sum N}$$

где  $N_1$ - $N_5$  — число пораженных растений в каждой из 5 групп,  $\sum N$  — общее число растений, использованных в эксперименте. В соответствии с предложенной методикой сорт считали устойчивым при  $1 \leq F_i \leq 2$ , умеренно восприимчивым при  $2 < F_i \leq 3$  и очень восприимчивым при  $F_i > 3$ .

Два других варианта использования эксплантов картофеля для оценки устойчивости сорта к *P. atrosepticum* приведены в исследовании I. Nudák (37). В обоих случаях брали растения в возрасте 30 сут, выращенные на среде MS в условиях, аналогичных описанным выше. В первом варианте растение инокулировали бактериальной суспензией *P. atrosepticum* при помощи стерильной зубочистки, которую погружали в суспензию, а затем прижимали к верхушке растения. Во втором варианте растения срезали на уровне 2-го узла, окунали срез в бактериальную суспензию и затем помещали их на 6 % среду MS. Степень пораженности растений оценивали через 72 ч по 6-балльной шкале: 1 балл — 0 % увядших листьев (высокоустойчивый), 2 балла — 1-25 % (устойчивый), 3 балла — 26-50 % (умеренно устойчивый), 4 балла — 51-75 % (умеренно восприимчивый), 5 баллов — 76-99 % увядших листьев (восприимчивый), 6 баллов — 100 % (высоковосприимчивый). Результаты оценки, выполненной двумя этими методами, хорошо согласовывались между собой, а также с данными тестов, проведенных на растениях картофеля в теплице. Среди испытанных сортов были выявлены как устойчивые (до 4 баллов), так и восприимчивые (> 4 баллов).

Оценка устойчивости к черной ножке с использованием эксплантов — достаточно надежный и эффективный метод и хорошо подходит для применения в селекционных центрах при работе со значительным количеством эксплантов. Выявление устойчивых клонов на этапе работы с эксплантами обеспечивает возможность быстрого воспроизводства высокоустойчивых растений в относительно небольшой промежуток времени.

Оценка устойчивости картофеля к черной ножке в условиях *in vitro* с использованием отделенных листьев. В случае, когда оценка на устойчивость к черной ножке предполагает дальнейшее использование растения, предпочтение отдается методу отделенных листьев, который также подходит для исследователей, не имеющих возможности работать с эксплантами.

P.S. Vains с соавт. (33) выращивали растения, полученные из эксплантов, истинных семян или микроклубней, на беспочвенной среде Terra-Lite 2000 в контролируемых условиях в течение 5-6 нед. На дно закрывающихся сосудов насыпали стерильный кремниевый песок и смачивали его инокулюмом ( $10^5$  КОЕ/мл). С растений каждого исследуемого сорта срезали по пять листьев с черешками длиной 85 мм и диаметром 2-3 мм и устанавливали их в песок срезом вниз на глубину 5 мм. После этого сосуды закрывали крышками и оставляли на 72 ч при 20 °С и 16-часовом фотопериоде. Устойчивость растений к патогену оценивали по длине пораженного участка черенка с использованием 4-балльной шкалы: 1 балл — 0-5 мм (высокоустойчивый), 2 балла — 6-10 мм (устойчивый), 3 балла — 11-50 мм (восприимчивый), 4 балла — > 50 мм (высоковосприимчивый). Аналогичная методика с небольшими модификациями была использована для оценки устойчивости к черной ножке трансгенных растений картофеля (38).

Преимущества этого метода — высокая воспроизводимость результатов, пригодность для массового скрининга и техническая простота. Чувствительность метода достаточно высока и обеспечивает удовлетворительные результаты при концентрации инокулюма  $10^4$ - $10^5$  КОЕ/мл. Кроме того, полученные результаты хорошо согласуются с данными полевой оценки устойчивости (39). Однако необходимо отметить, что в двух упомянутых исследованиях все сорта картофеля были отнесены к восприимчивым и высоковосприимчивым сортам. Устойчивые и высокоустойчивые образцы выявили только среди дикорастущих видов *Solanum* и соматических гибридов картофеля с родственными видами. Следовательно, применение такой методики целесообразно для поиска доноров устойчивости к черной ножке среди дикорастущих видов *Solanum* или оценки трансгенных растений с повышенной устойчивостью

Оценка устойчивости растений картофеля к черной ножке в контролируемых условиях. Этот способ предусматривает инокулирование бактериальной суспензией растений, выращенных в горшках в контролируемых условиях теплицы.

В исследовании О.А. Hidalgo с соавт. (31) растения нескольких клонов *S. tuberosum* subsp. *andigena* выращивали из клубней в горшках со смесью торфа, песка и почвы (1:2:3) в течение 4 нед при 25-30 °С. Затем растения, достигшие высоты примерно 35 см, инокулировали методом укола в пазуху 3-го листа зубочисткой, предварительно погруженной на 5 мин в суспензию бактериальных клеток *E. chrysanthemi*. Инокулированные растения помещали на 24 ч в закрытые влажные камеры (28-30 °С, влажность ~ 100 %), после чего переносили в теплицу и выдерживали в течение 3 сут при 25-30 °С в условиях повышенной влажности. По истечении этого срока устойчивость растений оценивали по длине пораженного участка стебля. Степень выявленных различий в устойчивости клонов зависела от концентрации бактериальной суспензии. При использовании инокулята  $5,5 \times 10^7$  КОЕ/мл к устойчивым были отнесены клоны с длиной пораженного участка стебля 5-20 мм, к промежуточным (умеренно устойчивым) — 33-36 мм, восприимчивым — 70-85 мм и высоковосприимчивым — 118-128 мм.

Более четкая шкала оценки была приведена А. Sima (37). Проростки картофеля укореняли на песочном субстрате на протяжении 14 сут, затем пересаживали на почву и подращивали в теплице еще 14 сут, после чего инокулировали стебли на высоте 5 см от почвы уколом стерильной зубочистки, смоченной в суспензии *P. atrosepticum*. Сразу после укола стебель обматывали лабораторной лентой Parafilm для предотвращения его высыхания. Зараженные растения выдерживали в теплице в течение 21 сут в условиях повышенной влажности, после чего измеряли длину пораженного участка стебля. Степень развития симптомов болезни оценивали при помощи следующей шкалы: 1 балл — 0-19 мм, 2 балла — 20-49 мм, 3 балла — 50-79 мм, 4 балла — 80-109 мм, 5 баллов — 110 мм, 6 баллов — гибель растения. Была показана высокая степень соответствия результатам, полученным при оценке тех же сортов в условиях *in vitro*.

Вариация описанного метода приводится в работе, посвященной получению трансгенных растений картофеля, устойчивых к бактериальным и грибным болезням (40). Полученные из эксплантов трансгенные растения выращивали на почве в течение 3-4 мес в климатических камерах (20 °С, 16-часовой фотопериод), а затем инокулировали бактериальной суспензией методом инъекции в прикорневую почку. Степень развития болезни оценивали через определенные промежутки времени: 1 балл — нет симптомов, 2 балла — небольшие проявления хлороза листьев, 3 бал-

ла — хлороз и некроз зрелых листьев, 4 балла — некрозы и увядание стебля, 5 баллов — гибель растения (приведенная шкала проиллюстрирована в исходной статье фотографиями).

Методика оценки устойчивости растений в контролируемых условиях может быть удобной при использовании в качестве посадочного материала ботанических семян картофеля, а также мини-, микро- и обычных клубней. Метод не следует выбирать в случае ограниченного количества семенного материала.

Методы оценки клубневой устойчивости к мягкой гнили. *Вакуумная инфльтрация.* Наиболее технически сложный метод инокуляции клубней. Поверхностно простерилизованные клубни погружают в бактериальную суспензию и выдерживают в течение 1 мин при отрицательном давлении  $-80$  кПа (41). После этого клубни укладывают в полиэтиленовые пакеты с небольшим количеством дистиллированной воды и выдерживают 3 сут при  $25$  °С, затем взвешивают, вымывают струей воды пораженные гнилью ткани и снова взвешивают. Степень поражения оценивают по соотношению массы пораженной и здоровой тканей. Применение этого метода позволяет бактериям проникать в ткани клубней через чечевички и имитирует состояние клубней во влажной почве, а также влажных клубней во время хранения (42). Помимо технической сложности, к несовершенствам метода можно отнести недостаточную воспроизводимость результатов (43).

*Точечная инокуляция в анаэробных условиях.* В вымытых и высушенных клубнях проделывают отверстия глубиной 10 мм вдоль продольной оси. На дно отверстия наносят стандартизованную по концентрации суспензию бактериальных клеток, после чего отверстие запечатывают смесью расплавленного воска и вазелина. Клубни помещают в пластиковые коробки, заполняют их азотом, запечатывают и выдерживают 6 сут при  $15$  °С, после чего измеряют ширину и глубину поражения тканей (44). Критерием оценки устойчивости клубня служит степень пораженности тканей Р, рассчитываемая по формуле:  $P = [W/2 + (D - 10)]/2$ , где W — ширина, D — глубина поражения тканей. Возможна также оценка по соотношению массы пораженных и здоровых тканей.

В упрощенном варианте этой методики простерилизованные клубни инокулируют посредством 2-3 уколов микрошприцом на глубину 2 см (31). Все места уколов располагают на одной стороне клубня и покрывают слоем вазелина, после чего клубни заворачивают во влажную фильтровальную бумагу и пластиковую пленку, помещают в пластиковые коробки и выдерживают 72 ч при  $25$  °С. После этого клубни разрезают через точки инокуляции и измеряют ширину пораженной области. Для оценки устойчивости авторами предложена следующая шкала: 0 баллов — ширина некроза тканей в месте инокуляции клубня 0-5 мм (устойчивый), 1 балл — 5,1-10 мм (умеренно устойчивый), 2 балла — 10,1-15 мм (восприимчивый), 3 балла —  $> 15$  мм (высоковосприимчивый).

Еще один вариант метода — инкубация целых клубней, предварительно погруженных на 20 мин в бактериальную суспензию, в камерах с постоянно поддерживаемой вводной взвесью, обеспечивающей постоянное присутствие на клубнях водной пленки (45). В результате содержание кислорода в тканях клубня быстро снижается, что способствует более сильному проявлению инфекции. Через 96 ч инкубации при  $20$  °С проводится оценка площади поражения (в процентах от общей площади поверхности клубня).

Использование методики, предусматривающей инкубацию клубней в условиях ограниченного доступа кислорода, обеспечивает прогрессивное

развитие инфекции и одновременно предотвращает реакцию клубня на повреждение в форме образования раневой перидермы. Как следствие, устойчивость сортов оказывается ниже, чем при оценке другими способами (46). Методика позволяет оценить, насколько ткани клубня подходят в качестве пищевой базы для патогена, имитировать условия, в которых клубни находятся во время хранения и перевозки, а также подходит для дифференцирующей оценки высокоустойчивого селекционного материала.

*Инокуляция ломтиков и высечек из клубней в аэробных условиях.* Для моделирования реакции клубня на раневую инфекцию в аэробных условиях, имитирующих ситуацию хранения клубней после уборки урожая, а также оценки их способности к заживлению раневой поверхности используется метод тестирования на ломтиках клубней в аэробных условиях (44). После поверхностной стерилизации клубня из него вырезают три ломтика толщиной около 10 мм; срезы располагают под прямым углом к продольной оси клубня. В каждом ломтике делают лунки глубиной и диаметром 5 мм, оставляют на 6 ч для инициации образования раневой перидермы, а затем инокулируют бактериальной суспензией. Поддоны с ломтиками заворачивают во влажную фильтровальную бумагу и выдерживают 3 сут при 15 °С. Устойчивость клубней определяют по диаметру пораженной ткани.

В более поздних исследованиях авторы инокулировали ломтики сразу после нарезания, не дожидаясь образования раневой перидермы (46-48). Существует также вариант инокуляции, при котором на ломтики или половинки клубней раскладывают диски из фильтровальной бумаги диаметром ~ 1 см, смоченные в бактериальной суспензии (46, 47, 49). Еще один способ описан I. Hudák с соавт. (48). После поверхностной стерилизации из клубней были сделаны цилиндрические высечки, которые затем разрезали на диски высотой 1 см (20-25 дисков на вариант). После взвешивания диски раскладывали в стерильные чашки Петри на влажную фильтровальную бумагу, наносили сверху по 0,1 мл бактериальной суспензии или воды и инкубировали при 26 °С в течение 24-26 ч. Затем диски отмывали от пораженных тканей, подсушивали, взвешивали повторно и оценивали устойчивость, используя в качестве критерия массу оставшихся здоровых тканей по отношению к исходной массе: 1 балл — < 5 % (высоковосприимчивый), 2 балла — 5,1-10 % (восприимчивый), 3 балла — 10,1-15 % (умеренно восприимчивый), 4 балла — 15,1-20 % (слабовосприимчивый), 5 баллов — 20,1-30 % (умеренно устойчивый), 6 баллов — > 30,1 % (устойчивый).

Инокуляция ломтиков или высечек сокращает общую продолжительность тестирования по сравнению с инокуляцией целых клубней. Недостаток метода — высокая вариабельность получаемых результатов при отсутствии стандартизации условий проведения эксперимента (46).

*Инокуляция целых клубней в аэробных условиях.* В последние годы появились разнообразные методики, предназначенные для инокуляции целых клубней с последующей инкубацией в аэробных условиях. Инокуляция может осуществляться посредством вдавливания пластикового наконечника для пипетки, содержащего небольшое количество инокулюма, в клубень на глубину 1-1,5 см (50-51). После инкубации клубней в условиях повышенной влажности (закрытые пластиковые контейнеры с влажной фильтровальной бумагой или влажные камеры) в течение 3 сут (51) или 6 сут (50) при 20-22 °С проводят оценку их устойчивости с использованием следующей шкалы: 0 баллов — отсутствие некроза тканей в месте инокуляции (устойчивый), 1 балл — ширина некроза < 2 мм (восприимчивый), 2 балла — 2-10 мм (восприимчивый), 3 балла — > 10 мм (восприимчивый).

В работе T. Thangavel с соавт. (52) описаны еще два варианта ино-

куляции. В первом случае осуществляли травматическое повреждение клубней падающим грузом со стальным наконечником с последующим кратковременным погружением поврежденного клубня в суспензию патогена. Во втором варианте в клубне штопором формировали отверстие глубиной около 10 мм, на дно которого наносили бактериальную суспензию. В обоих вариантах через 5 мин после инокуляции клубни взвешивали, заворачивали в пластиковую пленку, раскладывали в полиэтиленовые пакеты с влажной фильтровальной бумагой внутри и плотно закрывали. После 14-суточной инкубации в темноте при температуре 20-25 °С сгнившие ткани вымывали водой, клубни подсушивали, снова взвешивали и рассчитывали отношение массы пораженной ткани к массе здоровой. В качестве параметра, определяющего степень устойчивости клубня, возможно также использование объема пораженных тканей, определяемого по объему воды, который необходим для заполнения полости, остающейся после аккуратного удаления загнивших тканей (40, 53).

Факторы, влияющие на результаты лабораторной оценки устойчивости к черной ножке и мягкой клубневой гнили. При лабораторной оценке устойчивости растений картофеля к упомянутым заболеваниям необходимо принимать во внимание, что хотя она определяется в основном генетическими характеристиками (28), степень ее проявления зависит от ряда внешних факторов. К ним относятся качество семенного материала, физиологический статус клубней, количество и вирулентность инокулюма, поражение клубней другими патогенными микроорганизмами, погодные условия (температура, влажность) во время вегетации и уборки, повреждения клубней во время уборки, условия перевозки и хранения. Это приводит к необходимости строгого соблюдения одинаковых условий проведения эксперимента. Основные факторы, способные повлиять на результаты лабораторного тестирования и подлежащие стандартизации при планировании и проведении тестирования на устойчивость, перечислены ниже.

Во-первых, степень устойчивости зависит от происхождения инокулюма. Были показаны различия в устойчивости клонов картофеля к черной ножке, вызванной искусственной инокуляцией тремя разными возбудителями — *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* и *E. chrysanthemi* (31), а также различия в реакции клубней на заражение *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* и *P. atrosepticum* (54). Во-вторых, развитие бактериальной инфекции на клубнях зависит от температуры их тканей, а в случае инокуляции посредством погружения в бактериальную суспензию — еще и от температуры суспензии. Например, степень поражения, вызываемого *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, была выше для клубней, температура которых в момент инокуляции составляла 23-24 °С, чем для холодных (4 °С) или слишком теплых (26 °С) (55). В том же исследовании показали, что максимальное развитие клубневой гнили происходит при погружении теплых клубней в холодную (10 °С) суспензию. В-третьих, на степень поражения может существенно повлиять температура инкубации после инокуляции. Так, повышение температуры с 20 до 30 °С увеличивало диаметр зоны поражения на ломтиках картофеля при инокуляции *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* и *E. chrysanthemi* приблизительно на 25 %. В то же время следует отметить, что в случае *P. atrosepticum* это изменение составило всего 2,5 % (47). Наконец, при тестировании на ломтиках клубней степень поражения тканей сильно зависит от места, из которого был вырезан ломтик (или точки инокуляции на ломтике). Максимальное поражение ткани отмечали при использовании ломтиков из середины клубня, в то время как ломти-



ки, вырезанные из его апикальных частей, характеризовались заметно более высокой устойчивостью (46). Этот феномен был подтвержден на клубнях нескольких сортов. Дальнейшее исследование показало, что диаметр поражения оказывался существенно выше в случае инокуляции сердцевинной, а не периферической (кортекс) части ломтика. Так, в одном из экспериментов диаметр поражения для этих двух вариантов инокуляции составил соответственно 23,2 и 3,1 мм.

Таким образом, устойчивость картофеля к черной ножке и мягкой клубневой гнили слабо коррелирует между собой и требует отдельного тестирования. Выбор наиболее предпочтительного метода оценки зависит от целей исследователя, а также доступности используемого биологического материала, необходимого оборудования и помещений. Оценка устойчивости растений картофеля к черной ножке может выполняться в условиях *in vitro* на эксплантах или отделенных листьях, а также в контролируемых условиях на целых растениях. При оценке устойчивости клубней к мягкой бактериальной гнили возможно применение различных методов, моделирующих те или иные условия развития инфекции, с использованием как целых клубней, так и ломтиков или высечек из них. Эти методы включают в себя вакуумную инфльтрацию, а также точечную инокуляцию в анаэробных и аэробных условиях. В качестве критерия оценки клубневой устойчивости могут выступать размер некроза тканей в месте инокуляции, масса или объем пораженных тканей, а также отношение массы здоровых и пораженных тканей или площади пораженной поверхности к поверхности всего клубня. Важно отметить, что описанные методики анализа устойчивости к мягкой гнили не всегда дают сходные и сравнимые между собой результаты, поскольку предположительно активируют разные защитные механизмы. В связи с этим сравнение результатов, полученных различными методами клубневой оценки, может оказаться некорректным. При планировании и осуществлении экспериментов по оценке клубней на устойчивость к мягкой гнили следует также учитывать необходимость стандартизации ряда факторов, влияющих на конечные результаты. Несоблюдение этого условия сделает невозможным объективное сравнение полученных результатов между собой. В то же время следует отметить, что в отношении устойчивости растений к проявлению симптомов черной ножки исследования таких факторов практически не проводились, и проблема требует дополнительного изучения.

ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии,  
143050 Россия, Московская обл., Одинцовский р-н,  
пос. Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5,  
e-mail: nataafg@gmail.com ✉, kuznetsova@vniif.ru

Поступила в редакцию  
7 марта 2017 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2018, V. 53, № 1, pp. 111-122

## METHODS OF LABORATORY ASSESSMENT OF POTATO CULTIVARS FOR RESISTANCE TO BACTERIAL BLACKLEG AND TUBER SOFT ROT (review)

*N.V. Statsyuk, M.A. Kuznetsova*

All-Russian Research Institute of Phytopathology, Federal Agency for Scientific Organizations, 5, ul. Institute, pos. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii Region, Moscow Province, 143050 Russia, e-mail nataafg@gmail.com (✉ corresponding author), kuznetsova@vniif.ru

ORCID:

Statsyuk N.V. orcid.org/0000-0001-6159-148X

Kuznetsova M.A orcid.org/0000-0002-9880-5995

The authors declare no conflict of interests

Received March 7, 2017

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.111leng

### Abstract

Bacterial blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *ca-*

*rotovorum*, *P. atrosepticum*, and *Dickeya* spp. are among the most harmful diseases of potato. Average annual yield losses of potato caused by these bacteria make 10-15 %, but during epiphytotic they may exceed 50 %. Existing commercial potato cultivars do not possess high resistance to these diseases, since the most of current breeding programs do not consider this trait as a priority one. However, in recent years, global potato losses caused by blackleg and soft rot significantly increased that provided a growing demand for resistant cultivars and also for efficient methods for laboratory assessment of breeding material and new cultivars and hybrids for their resistance to these diseases. Weak correlation between the resistance of potato plants to the blackleg and soft rot results in the need of a parallel assessment for each of these two traits (R. Czajkowski et al., 2011). The choice of a preferable assessment method depends on the purpose of a study and the availability of biological material and required equipment and facilities. In large breeding centers, the assessment of potato resistance to the blackleg may be performed in vitro using potato explants. This approach is characterized by good reproducibility and reliability and provides a possibility for rapid large-scale production of revealed resistant genotypes (I. Hudák et al., 2006). If tested plants are planned to be used in further studies, then the detached leaf assay should be chosen (A. Sima et al., 2015). Results of this assay are usually in agreement with the results of field resistance assessment. The assay is preferable for a large-scale screening of resistance donors among wild *Solanum* species or transgenic potato lines. Breeders, who work with true potato seeds and mini-, micro-, and usual tubers, can use the method for potato resistance assessment under controlled conditions (V.S. Bisht et al., 1993). Tuber resistance to soft bacterial rot can be assessed using the vacuum infiltration method (M. Koppel, 1993) or the method of tuber or slice inoculation under anaerobic (R.A. Bain et al., 1988) or aerobic (I. Hudák et al., 2009) conditions. For aerobic conditions, the assessment may be carried out using whole tubers or their slices; in the last case, the duration of the experiment is significantly reduced (K.S. Tseng et al., 1990). The assessment criteria include the size of tissue necroses in the point of inoculation, weight or volume of affected tissues, and the ratio between the weights of healthy and affected tissues or between the areas of affected and healthy tuber surface. The choice of an assay and an assessment criterion depends on the purpose of the study and available resources. Comparison of results obtained by different methods may be incorrect. Planning and implementation of experiments on the assessment of tuber resistance to soft rot requires a standardization of some factors influencing on the final results; non-observance of this condition will make a comparison of obtained results impossible. Such crucial factors include the species of the inoculum, temperature of tuber tissues and bacterial suspension during inoculation stage, temperature of incubation after inoculation, and the point of inoculation or the part of tuber from which a slice was obtained. In the case of assessment of potato resistance to blackleg, the study of such factors was not conducted. This paper reviews in details advantages and disadvantages of the described approaches and factors and conditions able to influence on the results of assessment and on the possibility to compare results obtained in different experiments.

Keywords: potato, bacterial diseases, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya* spp., resistance assessment, bacterial blackleg, soft rot.

## REFERENCES

1. Torikov V.E., Bogomaz O.A. *Vestnik Bryanskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, 2008, 4: 53-59 (in Russ.).
2. Knyazev B.M., Dzagova D.A. *Zernovoe khozyaistvo*, 2004, 4: 8-9 (in Russ.).
3. Filippov A.V. *Zashchita i karantin rastenii*, 2012, 5: 61-88 (in Russ.).
4. Lazarev A.M., Khyutti A.V. O bakteriozakh kartofelya. *Sel'skokhozyaistvennyye vesti*, 2016, 1. Available <https://agri-news.ru/zhurnal/2016/12016/zashchita-rastenij/o-bakteriozax-kartofelya.html>. Accessed February 04, 2018 (in Russ.).
5. Stead D. Bacterial diseases of potato: relevance to in vitro potato seed production. *Potato Res.*, 1999, 42(3): 449-456 (doi: 10.1007/BF02358161).
6. Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev Yu.A., Elanskii S.N., Zhuromskii G.K., Zavriev S.K., Zeiruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov E.A., Sklyarova N.P., Stashevski Z., Uskov A.I., Yashina I.M. *Zashchita kartofelya ot boleznei, vreditelei i sornyakov* [Protection of potatoes from diseases, pests and weeds]. Moscow, 2009 (in Russ.).
7. Ignatov A.N. *Zashchita kartofelya*, 2014, 2: 53-57 (in Russ.).
8. De Boer S.H., Li X., Ward L.J. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, 2012, 102(10): 937-947 (doi: 10.1094/PHYTO-04-12-0083-R).
9. Hauben L., Moore E.R.B., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1998, 21(3): 384-397 (doi: 10.1016/S0723-2020(98)80048-9).
10. Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53: 381-391

- (doi: 10.1099/ijs.0.02423-0).
11. Samson R., Legendre J.B., Christen R., Fischer-Le Saux M., Achouak W., Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2005, 55(4): 1415-27 (doi: 10.1099/ijs.0.02791-0).
  12. Tominaga T., Ogasawara K. Bacterial stem rot of potato caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1979, 45(4): 474-477 (doi: 10.3186/jjphytopath.45.474).
  13. Cother E.J. Bacterial seed tuber decay in irrigated sandy soils of New South Wales. *Potato Res.*, 1980, 23(1): 75-84 (doi: 10.1007/BF02364027).
  14. Lumb V.M., Perombelon M.C.M., Zutra D. Studies of a wilt disease of the potato plant in Israel caused by *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathol.*, 1986, 35(2): 196-202 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1986.tb02004.x).
  15. Samson R., Foutier F., Saily M., Jouan B. Caracterisation des *Erwinia chrysanthemi* isolees de *Solanum tuberosum* et d'autres plantes-hotes selon les biovars et serogroupes. *EPPO Bulletin*, 1987, 17(1): 11-16 (doi: 10.1111/j.1365-2338.1987.tb00002.x).
  16. Serfontein S., Logan C., Swanepoel A.E., Boelema B.H., Theron D.J. A potato wilt disease in South Africa caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* and *E. chrysanthemi*. *Plant Pathol.*, 1991, 40(3): 382-386 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02394.x).
  17. Toth I.K., Van Der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrör L., Elphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathol.*, 2011, 60(3): 385-399 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x).
  18. Degefu Y., Potrykus M., Golanowska M., Virtanen E., Lojkowska E. A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland. *Ann. Appl. Biol.*, 2013, 162: 231-241 (doi: 10.1111/aab.12020).
  19. van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrör L., Manulis S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014, 64: 768-774 (doi: 10.1099/ijs.0.052944-0).
  20. Palacio-Bielsa A., Cambra M.A., Lopez M.M. Characterisation of potato isolates of *Dickeya chrysanthemi* in Spain by a microtitre system for biovar determination. *Ann. Appl. Biol.*, 2006, 148(2): 157-164 (doi: 10.1111/j.1744-7348.2006.00045.x).
  21. Czajkowski R., Grabe G.J., van der Wolf J.M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2009, 125(2): 263-275 (doi: 10.1007/s10658-009-9480-9).
  22. Slawiak M., Lojkowska E., van der Wolf J.M. First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathol.*, 2009, 58(4): 794 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02028.x).
  23. Laurila J., Hannukkala A., Nykyri J., Pasanen M., Helias V., Garland L., Pirhonen M. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2010, 126(2): 249-262 (doi: 10.1007/s10658-009-9537-9).
  24. Tsrör L., Erlich O., Leblush S., Hazanovsky M., Zig U., Slawiak M., Grabe G., van der Wolf J.M., van de Haar J. J. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2009, 123: 311-320 (doi: 10.1007/s10658-008-9368-0).
  25. Tsrör L., Erlich O., Lebiush S., van der Wolf J., Czajkowski R., Mozes G., Sikharulidze Z., Ben Daniel B. First report of potato blackleg caused by a biovar 3 *Dickeya* sp. in Georgia. *New Disease Reports*, 2011, 23: 1 (doi: 10.5197/j.2044-0588.2011.023.001).
  26. Tsrör L., Erlich O., Hazanovsky M., Ben Daniel B., Zig U., Lebiush S. Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions. *Plant Pathol.*, 2012, 61(1): 161-168 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02492.x).
  27. Ignatov A.N., Karlov A.N., Dzhalilov F.S., Karandashov V.E., Knyaz'kina M.S., Kornev K.P., Pekhtereva E.Sh. *Zashchita i karantin rastenii*, 2014, 11: 41-43 (in Russ.).
  28. Lyon G.D. The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp. — a review. *Plant Pathol.*, 1989, 38(3): 313-339 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1989.tb02152.x).
  29. Hijmans R.J., Spooner D.M. Geographic distribution of wild potato species. *Am. J. Bot.*, 2001, 88(11): 2101-2112 (doi: 10.2307/3558435).
  30. Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., van Veen J.A., van der Wolf J.M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathol.*, 2011, 60(6): 999-1013 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x).
  31. Hidalgo O.A., Echandi E. Evaluation of potato clones for resistance to tuber and stem rot induced by *Erwinia chrysanthemi*. *Am. Potato J.*, 1982, 59(12): 585-592 (doi: 10.1007/BF02867598).
  32. Pérombelon M.C.M., Salmond G.P.C. Bacterial soft rots. In: *Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Vol. 1. Prokaryotes*. U.S. Singh, R.P. Singh, K. Kohmoto (eds.). Pergamon, Oxford, 1995.
  33. Bains P.S., Bisht V.S., Lynch D.R., Kawchuk L.M., Helgeson J.P. Identification of stem soft rot

- (*Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica*) resistance in potato. *Am. J. Potato Res.*, 1999, 76(3): 137-141 (doi: 10.1007/BF02853578).
34. Lees A.K., de Maine M.J., Nicolson M.J., Bradshaw J.E. Long-day-adapted *Solanum phureja* as a source of resistance to blackleg by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Potato Res.*, 2000, 43(3): 279-285 (doi: 10.1007/BF02358087).
  35. Hudák I., Dobránszki J. In vitro methods for testing potato clones against soft rot *Erwiniae*. *Acta Horticulturae*, 2006, 725: 445-449 (doi: 10.17660/ActaHortic.2006.725.62).
  36. Hudák I. *Soft rot and fire blight susceptibility of in vitro potato and apple plantlets*. PhD dissertation. Budapest, 2014.
  37. Sima A., Mozafari J., Nader H., Cobra M. In vitro evaluation of resistant of potato cultivars against black leg disease (*Pectobacterium atrosepticum*). *Biological Forum — An International Journal*, 2015, 7(2): 1087-1094.
  38. Arce P., Moreno M., Gutierrez M., Gebauer M., Dell'Orto P., Torres H., Acuca I., Oligier P., Venegas A., Jordana X., Kalazich J., Holuigue L. Enhanced resistance to bacterial infection by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in transgenic potato plants expressing the attacin or the cep-cropin SB-37 genes. *Am. J. Potato Res.*, 1999, 76(3): 169-177 (doi: 10.1007/BF02853582).
  39. Bisht V.S., Bains P.S., Letal J.R. A simple and efficient method to assess the susceptibility of potato to stem rot by *Erwinia carotovora* subspecies. *Am. Potato J.*, 1993, 70(8): 611-616 (doi: 10.1007/BF02850850).
  40. Rivero M., Furman N., Mencacci N., Picca P., Toum L., Lentz E., Bravo-Almonacid F., Mentaberry A. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J. Biotechnol.*, 2012, 157(2): 334-343 (doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.11.005).
  41. McGuire R.G., Kelman A. Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. *Phytopathology*, 1984, 74(10): 1250-1256 (doi: 10.1094/Phyto-74-1250).
  42. Koppel M. Methods of assessing potato tubers for resistance to bacterial soft rot. *Potato Res.*, 1993, 36(3): 183-188 (doi: 10.1007/BF02360526).
  43. Bain R.A., Perombelon C.M. Methods of testing potato cultivars for resistance to soft rot of tubers caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Plant Pathol.*, 1988, 37(3): 431-437 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1988.tb02096.x).
  44. Lapwood D.H., Read P.J., Spokes J. Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathol.*, 1984, 33(1): 13-20 (doi: 10.1111/j.1365-3059.1984.tb00581.x).
  45. Tzeng K.S., McGuire R., Kelman A. Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Am. Potato J.*, 1990, 67(5): 287-305 (doi: 10.1007/BF02987271).
  46. Łojkowska E., Kelman A. Comparison of the effectiveness of different methods of screening for bacterial soft rot resistance of potato tubers. *Am. Potato J.*, 1994, 71(2): 99-113 (doi: 10.1007/BF02849113).
  47. Haynes K.G., Potts W.J.E., Goth R.W. Evaluation of the reliability of determining soft rot resistance in potatoes by the tuber slice method. *Am. Potato J.*, 1997, 74(4): 265-275 (doi: 10.1007/BF02851725).
  48. Hudák I., Hevesi M., Dobránszki J., Magyar-Tábori K. In vitro tests of resistance to soft rot *Erwiniae* on potato tubers. *Acta Horticulturae*, 2009, 812: 103-105 (doi: 10.17660/ActaHortic.2009.812.7).
  49. Ngadze E., Icishahayo D., Coutinho T.A., van der Waals J.E. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Dis.*, 2012, 96(2): 186-192 (doi: 10.1094/PDIS-02-11-0149).
  50. Rousselle-Bourgeois F., Priou S. Screening tuber-bearing *Solanum* spp. for resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (van Hall) Dye. *Potato Res.*, 1995, 38(1): 111-118 (doi: 10.1007/BF02358077).
  51. Marquez-Villavicencio M.D.P., Groves R.L., Charkowski A.O. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa. *Plant Dis.*, 2011, 95(3): 232-241 (doi: 10.1094/PDIS-07-10-0526).
  52. Thangavel T., Tegg R.S., Wilson C.R. Resistance to multiple tuber diseases expressed in somaclonal variants of the potato cultivar Russet Burbank. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: Article ID 417697 (doi: 10.1155/2014/417697).
  53. Pasco C., Bozec M., Ellisséche D., Andrivon D. Resistance behaviour of potato cultivars and advanced breeding clones to tuber soft rot caused by *Pectobacterium atrosepticum*. *Potato Res.*, 2006, 49(2): 91-98 (doi: 10.1007/s11540-006-9006-1).
  54. Ciampi-Panno L., Andrade-Soto N. Preliminary evaluation of bacterial soft rot resistance in native Chilean potato clones. *Am. Potato J.*, 1984, 61(2): 109-112 (doi: 10.1007/BF02852885).
  55. Bartz J.A., Kelman A. Bacterial soft rot potential in washed potato tubers in relation to temperatures of tubers and water during simulated commercial handling practices. *Am. Potato J.*, 1984, 61(8): 485-493 (doi: 10.1007/BF02852818).