

Защита растений Plant protection

DOI 10.22363/2312-797X-2021-16-1-66-76
УДК 631.427:632.23: 633.491:577.2

Научная статья / Research article

Совершенствование методов тестирования почвы на выявление спор возбудителя рака картофеля *Synchytrium endobioticum* с использованием молекулярных методов

Ю.В. Цветкова^{1,2*}, В.А. Яковлева¹

¹Всероссийский центр карантина растений (ВНИИКР),
Московская область, Российская Федерация

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
г. Москва, Российская Федерация
*yutska@mail.ru

Аннотация. Возбудитель рака картофеля гриб *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival. является ограниченно распространенным карантинным объектом на территории Российской Федерации. Основной путь распространения гриба — зараженные клубни картофеля и различный посадочный материал, содержащий частички почвы, зараженной спорами гриба. Одной из ключевых проблем в выявлении заболевания является применение в лабораторной практике достоверных методов прямого тестирования почвы на выявление покоящихся спор гриба без использования токсичных для персонала химических препаратов. Представлена апробация молекулярных методов диагностики почвы на выявление *S. endobioticum* методом прямого выделения ДНК гриба из почвенных образцов с использованием набора реагентов «MetaГен/ MetaGen». Идентификацию проводили с использованием набора серии «Фитоскрин» «*Synchytrium endobioticum*-РВ». Предварительно набор был апробирован с использованием ДНК, выделенной из наростов рака картофеля различными коммерческими наборами. Установлено, что оптимальным методом выделения ДНК из наростов для исследований является использование набора «ФитоСорб-Автомат 48» на роботизированной станции НК Тесап. Проведенные исследования показали, что чувствительность метода прямого выделения ДНК из почвенных образцов различной степени зараженности не уступает методу флотации с использованием четыреххлористого углерода. Данный метод позволяет работать с образцами почвы различных типов, включая торфянистые.

Ключевые слова: карантин растений, рак картофеля, *Synchytrium endobioticum*, диагностика, полимеразная цепная реакция

Заявление о конфликте интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Наборы реагентов компании-производителя ООО «НПФ Синтол» были официально закуплены учреждением-работодателем авторов ФГБУ «ВНИИКР». Проводилось тестирование наборов реагентов данной компании

© Цветкова Ю.В., Яковлева В.А., 2021



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/1>

на применимость для проводимых исследований, описанных в статье (выявление и идентификация патогена). Компания-производитель реагентов упоминается в статье исключительно с целью обеспечения воспроизводимости исследований.

Финансирование. Благодарности. Работа выполнена в рамках Гостемы НИР АААА-А20-120072060002-6.

История статьи:

Поступила в редакцию: 27 ноября 2020 г. Принята к публикации: 17 февраля 2021 г.

Для цитирования:

Цветкова Ю.В., Яковлева В.А. Совершенствование методов тестирования почвы на выявление спор возбудителя рака картофеля *Synchytrium endobioticum* с использованием молекулярных методов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агронимия и животноводство. 2021. Т. 16. № 1. С. 66—76. doi: 10.22363/2312-797X-2021-16-1-66-76

Improvement of soil testing techniques for detecting spores of potato wart disease *Synchytrium endobioticum* using molecular methods

Yulia V. Tsvetkova^{1,2*}, Vera A. Yakovleva¹

¹All-Russian Plant Quarantine Center, Moscow Region, Russian Federation

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

*Corresponding author: yutska@mail.ru

Abstract. *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival. is a pathogen of potato wart disease and has a restricted distribution on the territory of the Russian Federation. Its main pathways are infected potato tubers and different planting material containing soil particles infected with spores of the fungus. One of the main problems is the use of toxic chemicals during detecting the disease in laboratory methods of direct soil testing to identify resting spores. This paper presents the assessment of molecular methods of soil diagnosis for detection of *S. endobioticum* by direct extraction of fungal DNA from soil samples using the MetaGen reagent kit. Identification was performed using the 'Fitoskrin. *Synchytrium endobioticum*–RT' kit. The kit was pre-tested using DNA isolated from potato warts by various commercial kits. It was found that the optimal method of DNA isolation from the warts was using the 'FitoSorb–Avtomat 48' kit at the Tecan robotic station. Studies have shown that the sensitivity of the direct DNA extraction method from soil samples with various infection levels is the same as that of flotation method using carbon tetrachloride. Moreover, this method makes it possible to work with soil samples of different types, including peaty soils.

Key words: plant quarantine, potato wart disease, *Synchytrium endobioticum*, diagnostics, polymerase chain reaction

Conflicts of interest. The authors declare that there is no conflict of interest. The reagent kits of the manufacturing company "NPF Syntol" were officially purchased by VNIKR institution. The reagent kits of this company were tested for applicability to the studies described in the article (detection and identification of the pathogen). The reagent company is mentioned in the article solely for the purpose of assuring reproducibility of studies.

Acknowledgments. The authors acknowledge the support for the given study of the State Research Project АААА-А20-120072060002-6.

Article history:

Received: 27 November 2020. Accepted: 17 February 2020

For citation:

Tsvetkova YV, Yakovleva VA. Improvement of soil testing techniques for detecting spores of potato wart disease *Synchytrium endobioticum* using molecular methods. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2021; 16(1):66—76. (In Russian). doi: 10.22363/2312-797X-2021-16-1-66-76

Введение

Известно, что картофель является одной из самых поражаемых сельскохозяйственных культур, с ним связано 34 вида карантинных вредных организмов Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС. К числу данных видов относится возбудитель рака картофеля гриб *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Percival., имеющий ограниченное распространение на территории РФ.

Несмотря на то, что данное заболевание известно с конца XIX в., оно является очень значимым и строго контролируется на государственном уровне во многих странах мира. Актуальность данного заболевания связана также с проблемой появления вирулентных патотипов гриба, что усложняет процесс ликвидации очагов с применением устойчивых к раку сортов картофеля. Впервые сведения о внутривидовой дифференциации у *S. endobioticum* появились в 1942 г., когда в Германии был обнаружен новый патотип с повышенной вирулентностью [1–4]. Для удобства проведения идентификации была разработана стандартизированная система числового кодирования патотипов [5, 6]. В 2009 г. вирулентный патотип, кодируемый номером 38 (Nevsehir), был идентифицирован в Турции [7]. Последний патотип 39 (P1) был описан в Польше в 2015 г. [8].

Учитывая высокую вредоносность заболевания, длительный период жизнеспособности спор гриба в очаге и отсутствие эффективных мер борьбы, во многих странах мира действуют строгие карантинные фитосанитарные меры по контролю *S. endobioticum* [9]. В последние десятилетия данному заболеванию уделяется повышенное внимание в связи с выявлением большого количества вирулентных патотипов в различных странах, включая регион ЕОКЗР [7, 10–12].

В связи с ежегодным ввозом на территорию РФ семенного и продовольственного картофеля, а также другого посадочного материала, содержащего почву, сохраняется высокий фитосанитарный риск интродукции в страну *S. endobioticum*, в т.ч. новых вирулентных патотипов. В связи с этим большое значение имеет быстрое и достоверное определение зараженности почвы спорами *S. endobioticum*. С этой целью в российских лабораториях для выделения спор гриба традиционно используется метод флотации в четыреххлористом углеводе с последующим микроскопированием всплывшей органики и морфометрией выявленных спор. Существенным недостатком данного метода является использование высокотоксичного реактива и трудоемкость микроскопирования. Кроме того, метод дает низкую достоверность при тестировании торфянистой почвы из-за большого количества всплывающей органики.

С учетом отмеченных выше недостатков была предпринята попытка использования молекулярного метода тестирования почвы на выявление *S. endobioticum* методом прямого выделения ДНК гриба из почвенных образцов с использованием набора реагентов «МетаГен/МетаGen» производства ООО «НПФ Синтол» (Москва) с последующим проведением ПЦР «в реальном времени».

Цель исследования — совершенствование лабораторной диагностики на выявление возбудителя рака картофеля *S. endobioticum* из почвенных образцов с использованием метода прямого выделения ДНК патогена с последующей идентификацией ПЦР «в реальном времени».

Материалы и методы исследования

Для выделения спор *S. endobioticum* из почвенных образцов использовали метод флотации в четыреххлористом углеводе, а также метод выделения ДНК зоо-

спорангиев *S. endobioticum* с использованием готового набора реагентов «МетаГен/ MetaGen» с последующей идентификацией методом ПЦР «в реальном времени».

Образцы почвы, использованные для проведения экспериментов, описаны в табл. 1.

Таблица 1

Образцы почв, использованные для выделения спор *S. endobioticum*

Вариант	Образцы почвы	Количество спор гриба в 100 гр. почвы
1*	Искусственное заражение (супесчаная почва)	5
2*	Искусственное заражение (суглинистая почва)	5
3*	Искусственное заражение (супесчаная почва)	50
4*	Искусственное заражение (суглинистая почва)	50
5	Искусственное заражение (супесчаная почва)	500
6	Искусственное заражение (супесчаная почва)	5000
7	Искусственное заражение (супесчаная почва)	20000
8	Московская обл., старый очаг (торфянистая почва)	Неизвестно
9	Московская обл., очаг (суглинистая почва)	Неизвестно
10	Воронежская обл., старый очаг (супесчаная почва)	Неизвестно
11	Отрицательный контроль	0

*Данные варианты образцов почвы использовались только при испытании метода прямого выделения ДНК.

Table 1

Soil samples used for isolation of *S. endobioticum* spores

No.	Soil samples	Number of fungal spores per 100 g of soil
1*	Artificial inoculation (loamy sand)	5
2*	Artificial inoculation (loam)	5
3*	Artificial inoculation (loamy sand)	50
4*	Artificial inoculation (loam)	50
5	Artificial inoculation (loamy sand)	500
6	Artificial inoculation (loamy sand)	5000
7	Artificial inoculation (loamy sand)	20000
8	Moscow Region, old outbreak (peaty soil)	Unknown
9	Moscow Region, outbreak (loam)	Unknown
10	Voronezh Region, old outbreak (loamy sand)	Unknown
11	Negative control	0

* The soil samples were used only for the direct DNA extraction method.

Для искусственного заражения почвы высушенные наросты рака картофеля, содержащие зимние зооспорангии патогена, растирали в фарфоровой ступке и просеивали через набор сит. Фракцию, собранную с сита диаметром 0,25 мкм, содержащую споры гриба, использовали для приготовления инфекционной суспензии, затем рассчитывали концентрацию зооспорангиев в 1 мл суспензии, которую смешивали с почвенной навеской.

Для выделения спор гриба методом флотации в четыреххлористом углероде использовали методику, разработанную Н.А. Дорожкиным и К.Е. Шариковым [13]. Подсчет выделенных спор проводился путем полного просмотра всплывшей органики в трех повторностях в каждом варианте опыта.

Математическую обработку экспериментальных данных выполняли в программе EXCEL с помощью надстройки «Анализ данных».

Выделение ДНК из образцов почвы проводили с использованием коммерческого набора реагентов «МетаГен/MetaGen». Особенностью набора является возможность напрямую выделять ДНК из почвенного образца, где содержатся сильные ингибиторы ПЦР реакции (гуминовые кислоты, вторичные метаболиты бактерий и грибов и др.) [14].

Воздушно-сухой образец почвы каждого варианта массой 100 г тщательно растирался в фарфоровой ступке, просеивался через сито с диаметром отверстий 0,5 мм. Из образца отбиралась навеска 150 мг в трехкратной повторности.

Работа выполнялась согласно инструкции производителя за исключением количества почвенного образца, взятого для выделения ДНК. Разработчиками рекомендовано использовать 250...300 мг для выделения ДНК, однако при тестировании набора возникли трудности с перемешиванием буфера с навеской 250 мг, что вызвало затруднения при выделении ДНК. Поэтому в дальнейших исследованиях использовалась навеска 150 мг.

Для идентификации выделенной из почвенных образцов ДНК использовали диагностический набор реагентов серии «Фитоскрин» «*Synchytrium endobioticum*-PB», который был нами предварительно апробирован.

Для определения аналитической чувствительности использовали суспензию зооспорангиев, которую готовили аналогично суспензии для искусственного заражения почвенных образцов, и применяли 3 повторности с уровнем зараженности 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 клеток целевого организма на миллилитр. Затем из каждой концентрации отбирали по 100 мкл суспензии гриба в 3 повторностях и центрифугировали при 13000 об/мин. Супернатант сливали, не задевая осадка. Полученные образцы использовали для выделения ДНК.

В качестве отрицательного контроля использовали чистый образец, свободный от возбудителя рака картофеля.

ПЦР осуществляли на амплификаторе C1000 Touch CFX96 (BioRad).

Пороговым циклом считали $C_t = 40$, согласно рекомендациям производителя.

Набор реагентов «*Synchytrium endobioticum*-PB» включает готовую реакционную смесь «S. Endo.-ВПК» (20 мкл на 1 образец), SynTaq ДНК-полимераза T+ (0,5 мкл на 1 образец). К реакционной смеси добавляли 5 мкл ДНК образца. Условия амплификации: 95 °C — 300 с — 1 цикл; 60 °C — 40 с, 95 °C — 15 с — 45 циклов.

Для сравнительного анализа чувствительности *Synchytrium endobioticum*-PB проводили выделение ДНК из наростов рака картофеля с помощью наборов

«МетаГен/MetaGen», «ДНК-Экстран-2» и «ФитоСорб-Автомат-48» производства ООО «НПФ Синтол».

Выделение ДНК с помощью набора «ФитоСорб-Автомат-48» было проведено с использованием автоматической станции НК TECAN.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты выделения спор *S. endobioticum* из почвенных образцов методом флотации в четыреххлористом углероде приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты выделения спор *S. endobioticum* с использованием метода флотации

Вариант	Количество спор гриба в 100 г почвы	Количество выделенных спор <i>S. endobioticum</i> из 100 г почвы	Эффективность выявления спор гриба, %
5	500	180,87 ± 44,9	36,17
6	5000	492,64 ± 53,66	9,85
7	20000	849,45 ± 54,52	4,24
8	Неизвестно	Не проводилось	–
9	Неизвестно	230,2 ± 44,7	–
10	Неизвестно	0	–
Отрицательный контроль К-	0	0	–

Table 2

Results of direct testing of soil samples for presence of *S. endobioticum* spores using carbon tetrachloride

No.	Number of fungal spores per 100 g of soil	Number of fungal spores isolated from 100 g of soil	Effectiveness, %
5	500	180.87 ± 44.9	36.17
6	5000	492.64 ± 53.66	9.85
7	20000	849.45 ± 54.52	4.24
8	Unknown	Not conducted	–
9	Unknown	230.2 ± 44.7	–
10	Unknown	0	–
Negative control K-	0	0	–

Полученные результаты показали, что эффективность метода флотации в четыреххлористом углероде очень мала, что связано с большими потерями зооспорангиев на разных стадиях выделения.

При работе с торфянистыми почвами (вариант 8) данный метод практически неприменим из-за большого количества всплывающей органики, что затрудняет

обнаружение зооспорангиев и значительно увеличивает временные затраты на просмотр препаратов.

В результате тестирования набора для идентификации патогена «*Synchytrium endobioticum*-PB» были получены экспоненциальные кривые флюоресценции накопления ДНК и значение порогового цикла Ct образцов, в которых FAM < 40, что подтвердило наличие патогена в исследуемых образцах и применимость тест-системы «*Synchytrium endobioticum*-PB» для идентификации возбудителя рака картофеля.

Определена аналитическая чувствительность тест-системы. Было установлено, что порогом выявления ДНК возбудителя для данной тест-системы является 100% выявление при втором разведении ДНК, что составило 3×10^3 клеток гриба/мл (табл. 3).

Таблица 3

Определение аналитической чувствительности *Synchytrium endobioticum*-PB

Разведение ДНК	Концентрация клеток гриба, кл/мл	<i>Synchytrium endobioticum</i> -PB		
		Значение порогового цикла Ct		
		1	2	3
0	10^5	17.86	17.76	18.03
1	10^4	22.02	21.53	21.99
2	10^3	32.06	36.06	30.92
3	10^2	39.49	–	–
4	10^1	–	–	–
5	10^0	–	–	–
	K+	31.98	31.15	30.92
	K-v	–	–	–
	K-ч	–	–	–

Table 3

Analytical sensitivity of «*Synchytrium endobioticum*-RT»

DNA dilution	Concentration of fungal cells, cells/ml	<i>Synchytrium endobioticum</i> -RT		
		Cycle threshold Ct		
		1	2	3
0	10^5	17.86	17.76	18.03
1	10^4	22.02	21.53	21.99
2	10^3	32.06	36.06	30.92
3	10^2	39.49	–	–
4	10^1	–	–	–
5	10^0	–	–	–
	K+	31.98	31.15	30.92
	K-v	–	–	–
	K-ch	–	–	–

Далее был проведен ряд экспериментов по выделению ДНК патогена непосредственно из зараженных образцов почвы. Необходимо отметить, что с помощью прямого метода происходит выделение тотальной ДНК, а дальнейшее проведение ПЦР «в реальном времени» позволяет определить наличие/отсутствие патогена в образце.

Результаты, полученные при тестировании почвы различной степени зараженности, различались незначительно. Так, при заражении почвы 500 зооспорангиев в 100 г почвы в среднем пороговый цикл Ct составил 36,6, при заражении 20 000 зооспорангиев в 100 г почвы — 33,9, а при заспоренности 5 000 зооспорангиев в 100 г почвы — 33,3 (табл. 4). При этом наблюдается высокое различие в проворностях по пороговым циклам. Такие результаты могли возникнуть по ряду причин. Например, при просеивании образцов почвы и подготовке навески неизменно теряется неопределенная часть спор гриба.

Таблица 4

**Результаты выделения ДНК из образцов почвы
с последующей идентификацией с помощью ПЦР «в реальном времени»**

Образец	Количество спор гриба в 100 г почвы	Значение порогового цикла Ct		
		1	2	3
1	5	—	—	—
2	5	—	—	—
3	50	39,61	—	—
4	50	39,24	—	—
5	500	35,42	35,10	39,47
6	5000	34,16	32,21	33,49
7	20000	34,41	32,80	34,65
8	Неизвестна	38,15	28,74	33,88
9	Неизвестна	37,41	35,55	36,97
10	Неизвестна	41,61	33,20	33,56
11	0	—	—	—
K+*	—	33.48	31.98	32.17
K+з**	—	17.86	17.76	18.03
K-в	—	—	—	—
K-ч	—	—	—	—

* Положительный контроль набора «*Synchytrium endobioticum*-PB».

** Положительный контроль, ДНК, выделенная из нароста рака картофеля.

Table 4

DNA extraction from soil samples with Real-time PCR identification

Sample	Number of fungal spores per 100 g of soil	Cycle threshold Ct		
		1	2	3
1	5	–	–	–
2	5	–	–	–
3	50	39.61	–	–
4	50	39.24	–	–
5	500	35.42	35.10	39.47
6	5000	34.16	32.21	33.49
7	20000	34.41	32.80	34.65
8	Unknown	38.15	28.74	33.88
9	Unknown	37.41	35.55	36.97
10	Unknown	41.61	33.20	33.56
11	0	–	–	–
K+*	–	33.48	31.98	32.17
K+z**	–	17.86	17.76	18.03
K-v	–	–	–	–
K-ch	--	–	–	–

* Positive control of «*Synchytrium endobioticum*-RT» reagent kit.

** Positive control, DNA, extracted from a potato wart.

Кроме того, одной из причин, могут быть сами компоненты, входящие в набор для выделения ДНК, которым может не хватать связывающей способности, так как в почве находятся другие организмы, ДНК которых также выделяется при использовании набора. Слишком большое количество биомассы может приводить, с одной стороны, к ингибированию, а с другой, к связыванию с сорбирующими частицами нецелевых молекул ДНК, «конкурируя» с молекулами ДНК исследуемого патогена.

В связи с нелинейным и случайным колебаниями циклов при различной концентрации ДНК невозможно точно определить степень заражения образцов.

Таким образом, метод выделения зооспорангиев с использованием флотации в четыреххлористом углеводе не превосходит по чувствительности метод прямого выделения ДНК патогена из почвы: при использовании обоих методов удалось выявить патоген при концентрации 500 зооспорангиев на 100 г почвы. Кроме того, при проведении экспериментов ДНК патогена обнаружили в образцах почвы из старого очага Воронежской области, что не удалось сделать методом флотации.

Преимуществом молекулярного метода является возможность работы с торфянистыми почвами.

Заключение

Проведен сравнительный анализ двух методов выявления и идентификации возбудителя рака картофеля при прямом тестировании почвы — метода флотации в четыреххлористом углероде и метода выделения ДНК из образцов почвы с дальнейшей идентификацией с помощью ПЦР «в реальном времени». Показано, что оба метода сопоставимы по чувствительности. Кроме того, использование молекулярного метода позволяет тестировать любой тип почвы.

Таким образом, метод прямого выделения ДНК из почвы с последующей постановкой ПЦР «в реальном времени» может быть использован как альтернатива методу флотации с использованием токсичных веществ.

Библиографический список / References

1. Braun H. Biologische Spezialisierung bei *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) Und Pflanzenschutz*. 1942; 52(11):481—486.
2. Hey A. Die Biotypenforschung beim Erreger des Kartoffelkrebses *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in Deutschland. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienst*. 1948; 2:1—3.
3. Hey A. Zur Biotypenfrage des Kartoffelkrebses. *Mitt. Biol. Zentralanst. f. Land u. Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)*. 1953; 75:173—175.
4. Hey A. *Stand und Aussichten der Pflanzenquarantäne im Kartoffelbau*. Leipzig: S. Hirzel; 1954.
5. Baayen RP, Bonthuis H, Withagen JCM, Wander JGN, Lamers JL, Meffert JP, et al. Resistance of potato cultivars to *Synchytrium endobioticum* in field and laboratory tests, risk of secondary infection, and implications for phytosanitary regulations. *EPPO Bulletin*. 2005; 35(1):9—23. doi: 10.1111/j.1365-2338.2005.00775.x
6. Baayen RP, Cochius G, Hendriks H, Meffert JP, Bakker J, Bekker M, et al. History of potato wart disease in Europe — a proposal for harmonisation in defining pathotypes. *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 116:21—31. doi: 10.1007/s10658-006-9039-y
7. Çakir E, Van Leeuwen GCM, Flath K, Meffert JP, Janssen WAP, Maden S. Identification of pathotypes of *Synchytrium endobioticum* found in infested fields in Turkey. *EPPO Bulletin*. 2009; 39(2):175—178. doi: 10.1111/j.1365-2338.2009.02285.x
8. Przetakiewicz J. First report of new pathotype 39(P1) of *Synchytrium endobioticum* causing potato wart disease in Poland. *Plant Disease*. 2015; 99(2):285—286. doi: 10.1094/PDIS-06-14-0636-PDN
9. EPPO Standards. PM 9/5 (2). *National regulatory control systems for Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin; 2017.
10. van de Vossen BTLH., van Gent-Pelzer MPE, Boerma M, van der Gouw LP, van der Lee TAJ, Vossen JH. An alternative bioassay for *Synchytrium endobioticum* demonstrates the expression of potato wart resistance in aboveground plant parts. *Phytopathology*. 2019; 109(6):1043—1052. doi: 10.1094/PHYTO-01-19-0024-R
11. Dimitrova L, Laginova M, Becheva A, van Leeuwen GCM. Occurrence of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in Bulgaria: identification of pathotype(s) present. *EPPO Bulletin*. 2011; 41(2):195—202. doi: 10.1111/j.1365-2338.2011.02453.x
12. Vloutoglou I, van Leeuwen GCM, Eleftheriadis E, Sarigkoli I, Simoglou KB, Tsirogiannis D, et al. First report of potato wart disease caused by *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in Greece: detection, impacts and pathotype identification. *Hellenic Plant Protection Journal*. 2015; 8 (S1):9Special issue.
13. Dorozhkin NA, Sharikov KE. *Instruktsiya po opredeleniyu zarazhennosti pochvy rakom kartofelya (Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc. [Instructions on determining soil infection with potato wart (Synchytrium endobioticum (Schilb.) Perc.)]*. Minsk; 1950. (In Russ).
14. Дорожкин Н.А., Шариков К.Е. Инструкция по определению зараженности почвы раком картофеля (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.). Минск, 1950. 8 с.
15. EasyWay product line kits. Available from: <https://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-vydeleniya-dnk-i-rnk/nabory-reagentov-easyway.html> [Accessed 11.03.2020]. (In Russ.)
16. Наборы реагентов «EasyWay». Режим доступа: <https://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-vydeleniya-dnk-i-rnk/nabory-reagentov-easyway.html> Дата обращения: 11.03.2020.

Об авторах:

Цветкова Юлия Владиславовна — младший научный сотрудник лаборатории микологии испытательного лабораторного центра, Всероссийский центр карантина растений, 140150, Российская Федерация, Московская обл., г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; аспирант биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; e-mail: yutska@mail.ru

SPIN-код: 2744-1123

ORCID 0000-0002-4334-9224

Яковлева Вера Алексеевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник — начальник отдела фитосанитарной биологии, Всероссийский центр карантина растений, 140150, Российская Федерация, Московская обл., г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; e-mail: yakovleva_va@mail.ru

SPIN-код автора: 9008-9534

ORCID 0000-0002-9827-6587

About authors:

Tsvetkova Yulia Vladislavovna — Junior Researcher, Mycology Laboratory, All-Russian Plant Quarantine Center, 32, Pogradichnaya st., Bykovo, Ramensky district, Moscow region, 140150, Russian Federation; PhD student, Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1/12 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation; e-mail: yutska@mail.ru

SPIN-code: 2744-1123

ORCID 0000-0002-4334-9224

Yakovleva Vera Alekseevna — PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Head of Phytosanitary Biology Department, All-Russian Plant Quarantine Center, 32, Pogradichnaya st., Bykovo, Ramensky district, Moscow region, 140150, Russian Federation; e-mail: yakovleva_va@mail.ru

SPIN-code: 9008-9534

ORCID 0000-0002-9827-6587