

Оригинальная статья / Original article

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2024-5-12-17>
УДК: 635.64-047.37:632.444.2

Н.В. Хунвану^{1*}, Г.Ф. Монахос², С.Г. Монахос¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» 127434, Москва, ул. Тимирязевская, 49

² ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева» 127550, Россия, Москва, ул. Пасечная, д.5

*Автор для переписки:
hounvnic87@yahoo.com

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением 075-15-2023-220 на поддержку программы развития университета «Приоритет-2030».

Конфликт интересов. Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Монахос Г.Ф., Монахос С.Г.: концептуализация, методология, верификация и администрирование данных, ресурсы, редактирование рукописи; Хунвану Н.В.: проведение исследования, формальный анализ, создание рукописи.

Для цитирования: Хунвану Н.В., Монахос Г.Ф., Монахос С.Г. Фенотипический и молекулярно-генетический скрининг устойчивости образцов томата к фитофторозу. *Овощи России*. 2024;(5):12-17. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2024-5-12-17>

Поступила в редакцию: 15.08.2024

Принята к печати: 02.09.2024

Опубликована: 27.09.2024

Nicaise V. Hounwanou^{1*}, Grigory F. Monakhos², Sokrat G. Monakhos¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy” 49, Timiryazevskaya str., Moscow, 127434, Russia

² Breeding Station named after N.N. Timofeev 5, Pasechnaya str., Moscow, 127550, Russia

*Corresponding Author: hounvnic87@yahoo.com

Acknowledgements. The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in accordance with agreement 075-15-2023-220 to support the University’s development program «Priority-2030».

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interests.

Authors’ Contribution: Monakhos G.F., Monakhos S.G.: conceptualization, methodology, data verification and administration, resources, editing of the manuscript; Hounwanou N.V.: conducting research, formal analysis, manuscript creation.

For citation: Hounwanou N.V., Monakhos G.F., Monakhos S.G. Evaluating tomato lines resistance to Late Blight and molecular genetic screening with the use of molecular markers. *Vegetable crops of Russia*. 2024;(5):12-17. (In Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2024-5-12-17>

Received: 15.08.2024

Accepted for publication: 02.09.2024

Published: 27.09.2024

Фенотипический и молекулярно-генетический скрининг устойчивости образцов томата к фитофторозу

Check for updates



РЕЗЮМЕ

Актуальность. Фитофтороз томата, вызываемый *Phytophthora infestans*, в прохладных и влажных условиях среды может приводить к потере практически 100% урожая в условиях открытого грунта. При этом генетические особенности *P. infestans* позволяют со временем преодолевать генетическую устойчивость растений-хозяев, что требует от селекционеров искать новые гены устойчивости к фитофторозу и получать новые сорта, обладающие сразу несколькими генами устойчивости.

Цель. Фенотипический и молекулярно-генетический скрининг коллекции томата на устойчивость к *P. infestans* и оценка возможности использования молекулярных маркеров для маркер-опосредованной селекции.

Материалы и методы. Из коллекции Селекционной станции имени Н.Н. Тимофеева были получены 12 линий томата, что в общей сложности составило 335 растений, которые были высажены в условия искусственного инфекционного фона. 12 растений линии Кр6 были использованы для молекулярно-генетического скрининга с маркерами, ассоциированными с генами устойчивости паслёновых к фитофторозу *Ph-3*, *R1*, *R3a*.

Результаты. Фенотипическая оценка устойчивости томата к фитофторозу на искусственном инфекционном фоне выявила 1 линию без симптомов поражения заболеванием, 5 линий полностью пораженных фитофторозом, и 6 линий, в которых наблюдали расщепление по проявлению симптомов поражения. Молекулярно-генетическое исследование выявило, что устойчивые растения были гетерозиготами по гену *Ph-3*. Кроме того, большая часть исследованных растений имела ген *R1*, который, однако, при отсутствии гена *Ph-3*, не обеспечивал устойчивость растений к фитофторозу.

Заключение. В результате фенотипического и молекулярно-генетического скрининга генетической коллекции томата выявлены образцы-доноры устойчивости к фитофторозу томата для использования в селекции. Показана возможность использования ДНК-маркеров, ассоциированных с генами *Ph-3* и *R1*, для маркер-опосредованного отбора. Кроме того, было подтверждено, что наличие двух генов устойчивости обеспечивает растениям томата более эффективную защиту от *P. infestans*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

томат, фитофтороз, маркер-опосредованный отбор, устойчивость, генетическая коллекция

Evaluating tomato lines resistance to Late Blight and molecular genetic screening with the use of molecular markers

ABSTRACT

Relevance. Tomato late blight caused by *Phytophthora infestans* can cause almost 100% yield loss in open ground in cool and humid conditions. At the same time, the genetic characteristics of *P. infestans* allow it to overcome the genetic resistance of host plants over time, which requires breeders to look for new genes for resistance to late blight and to obtain new varieties that have several resistance genes at once.

Material and methods. 12 tomato lines, or a total of 335 plants, were obtained from the N.N. Timofeev breeding station collection and planted in an artificially infected background. For molecular genetic screening, 12 plants from the Kr6 line were used. The markers linked to the late blight resistance genes *Ph-3*, *R1*, and *R3a* were utilized.

Results. On an artificial infectious background, phenotypic evaluation of tomato resistance to late blight showed 1 line of plants free of pathogen damage, 5 lines of plants fully afflicted by late blight, and 6 lines with only partial plant damage. According to molecular genetic investigation the resistant plants were heterozygotes for the *Ph-3* gene. Furthermore, the *R1* gene was present in most of the plants under study; but, without the *Ph-3* gene, this gene did not provide plant resistance against late blight.

Conclusions. The results of this research led to the selection of tomato plants for further breeding that were resistant to late blight. It was shown that markers linked to the *Ph-3* and *R1* genes might be used for marker-mediated selection. Furthermore, it has been established that tomato plants are more effectively protected against *P. infestans* when several resistance genes are present.

KEYWORDS:

tomato, late blight, marker-assisted selection, resistance, germplasm

Введение

Фитофтороз, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, – одна из основных болезней представителей паслёновых, в том числе и томата (*Solanum lycopersicum* L.), по всему миру, особенно в регионах с относительно низкими температурами и высокой влажностью [1]. При этом потери урожая томата из-за поражения фитопфторозом могут достигать от 41 до 100% в открытом грунте и от 12 до 65% в открытом грунте при использовании фунгицидов [2]. Единственным способом эффективного и устойчивого контроля за распространением *P. infestans* прежде всего остаётся использование созданных ранее и создание новых устойчивых сортов томата, дополненное селективным применением фунгицидов, удаление поражённых растений и рядом других агротехнических приёмов [3, 4].

Естественная устойчивость к фитопфторозу была обнаружена у ряда диких родственников томата, таких как *S. pimpinellifolium* L., *S. habrochaites* S.Knapp & D.M.Spooner и *S. pennellii* Correll, и было выделено 6 генов (*Ph-1*, *Ph-2*, *Ph-3*, *Ph-4*, *Ph-5-1* и *Ph-5-2*), отвечающих за этот признак [5]. Гены *Ph-1* и *Ph-2* были первыми картированы и переданы от *S. pimpinellifolium* к *S. lycopersicum*, однако устойчивость к *P. infestans*, которую получили новые сорта, была со временем преодолена патогеном [6]. Впоследствии к *S. lycopersicum* был передан ген *Ph-3*, который обеспечивал устойчивость к тем расам *P. infestans*, которые преодолели устойчивость к генам *Ph-1* и *Ph-2* [3]. Ген *Ph-3* активно используется в различных селекционных программах [2], однако устойчивость к поражению фитопфторозом, которую он обеспечивает, оказалась так же раса-специфичной и на данный момент уже преодолена рядом рас *P. infestans* [2, 5].

Ряд других генов, например, *R1* и *R3a*, обеспечивающих устойчивость к *P. infestans*, известных для паслёновых в целом, лучше всего были охарактеризованы у картофеля (*S. tuberosum* L.) и его близких родственников, таких как, например, *S. demissum* Lindl., хотя и их устойчивость была частично преодолена [7-9].

Преодоление устойчивости в создаваемых сортах томата *P. infestans* обусловлено генетическими особенностями её генома [5]. Способность преодолевать защитные механизмы растения-хозяина обеспечивается изменением ploидности, масштабным делециям, которые могут удалять из генома факторы, распознаваемые растением-хозяином, изменениями в паттернах экспрессии генов и высокой активностью транспозонов [10]. В связи с этим, одним из направлений селекции томата на устойчивость к фитопфторозу представляется накопление в растении множества генов устойчивости, которые в совокупности позволяют лучше защитить растение, что уже было продемонстрировано на примере взаимного действия *Ph-2* и *Ph-3* генов [11].

В России, хотя фитопфтороз является одним из самых вредоносных заболеваний томата, выращиваемого в открытом грунте, научные работы, посвященные поиску генов-маркеров устойчивости томата к фитопфторозу, практически отсутствуют. В связи с этим, целью настоящей работы стало тестирование ряда известных молекулярных маркеров, ассоциированных

с генами устойчивости к фитопфторозу, на возможность их дальнейшего использования в маркер-опосредованной селекции, фенотипический и молекулярно-генетический скрининг генетической коллекции томата.

Материалы и методы

Генетическая коллекция образцов томата была получена из ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева». Для проведения исследования были использованы 12 линий томата, которые были высажены и выращены в открытом грунте на территории Селекционно-семеноводческого центра овощных культур ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А.Тимирязева в 2023 году. В общей сложности было изучено 335 растений.

Для создания искусственного инфекционного фона были собраны образцы *P. infestans* в естественной среде. Пораженные *P. infestans* листья собирали и выдерживали при температуре +4°C в течение 4 часов. Затем зараженные листья переносили в дистиллированную воду на 15 минут для создания суспензии инокулята. Полученную суспензию ооспор *P. infestans* использовали для двукратной инокуляции растений томата.

Раствор инокулята ооспор *P. infestans* наносили на все растения томата около 10 часов утра за несколько дней до цветения. Оценку устойчивости растений проводили только на основании факта наличия или отсутствия поражения фитопфторозом по стандартной методике [12]. Симптомы поражения определяли визуально по характерным признакам: наличие пятен на листьях и плодах томата с белым мицелием, которые со временем увеличивались в размерах и становились черными, наличие коричневой мраморности на плодах.

Для проведения молекулярно-генетического скрининга устойчивости к *P. infestans* была отобрана линия томата Кр6 с четкой фенотипической дифференциацией растений на пораженные фитопфторозом растения и растения без симптомов поражения. С каждого растения было собрано 100-150 мг молодых листьев для выделения ДНК методом СТАВ (цетилтриметиламмония бромид) [13]. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer N50 (Implen, Германия).

Выделенную ДНК использовали для проведения ПЦР реакции по стандартной методике с 0,25 ед. ДНК-полимеразы Taq (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя в амплификаторе Bio-Rad T100 (Bio-Rad, США) по программе, описанной Mullis [14].

Для выявления наличия гена *Ph-3* в исследуемых образцах использовали разработанный прежде для картофеля CASP (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) молекулярный маркер TG328 [12]. Для амплификации маркера TG328 размером 500 п.н. использовали прямой праймер 5-GGTGATCTGCTTATAGACTTGGG-3 и обратный 5-AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC-3. Гидролиз ампликонов проводили в течение 16 часов с использованием 0,9 ед. на 10 мкл ПЦР-продукта эндонуклеазы рестрикции BstNI. Ожидаемые фрагменты ДНК после успешного гидролиза продуктов амплификации составляют 260 и 240 п.н.

Наличие *R*-генов *R1* и *R3a* в исследуемых растениях определяли при помощи разработанных ранее SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) молекулярных маркеров [8, 15]. Для выявления гена *R1* использовали молекулярные маркеры *R1*-1400 (прямой праймер 5-CACTCGTGACAT-ATCCTCACTA-3; обратный 5-CAACCCTGGCATGCCACG-3) и *R1*-1250 (прямой праймер 5-CACTCGTGACATATCCTCACTA-3; обратный 5-GTAGTACSTATCT-TATTTCTGCAAGAAT-3) с ожидаемыми размерами продуктов амплификации 1400 п.н. и 1250 п.н. соответственно [8]. Для выявления гена *R3a* использовали молекулярные маркеры *RT-R3a* (прямой праймер 5-ATCGTTGT-CATGCTATGAGATTGTT-3; обратный 5-CTTCAAGGTAGTGGGCAG-TAGCTT-3) и *R1380* (прямой праймер 5-TCCGACATGTATTGATCTCCCTGAGCCA-3; обратный 5-CTTCAGCTTCTTACAGTAGG-3) с ожидаемыми размерами продуктов амплификации 1000 п.н. и 1380 п.н. соответственно [16].

Продукты амплификации окрашивали интеркалирующим красителем GelRed и разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле по стандартной методике. В качестве маркера молекулярных весов использовали ДНК-маркер Step100 (Биолабмикс, Россия), содержащий фрагменты ДНК длиной от 100 до 1000 п.н.

Результаты

Оценка фенотипического проявления признака устойчивости к фитофторозу на искусственном инфекционном фоне

Изучение фенотипического проявления устойчивости среди изучаемых 12 линий растений томата выявило одну линию томата, в которой растения не демонстрировали признаков поражения *P. infestans*, 6 линий,

в которых наблюдались как пораженные *P. infestans* растения, так и растения без признаков поражения, и 5 линий, в которых все растения демонстрировали признаки поражения *P. infestans* (см. рис. 1; см. табл. 1).

Среди 6 расщепляющихся линий, в которых встречались как пораженные *P. infestans* растения, так и растения без следов поражения, фенотипическое расщепление по признаку отсутствия или наличия поражения патогеном варьировало от 1,6:1 до 4,4:1 (см. табл. 1). Лишь в одной линии, Кр4, соотношение соответствует 3:1. При этом стоит отметить, что после инокуляции патогеном поражение растений происходило не одновременно. В ряде случаев отдельные растения начинали демонстрировать признаки поражения *P. infestans* только в конце вегетационного периода.

Молекулярно-генетический скрининг генетической коллекции томата на наличие генов устойчивости к фитофторозу

Для проведения молекулярно-генетического скрининга растений томата на наличие устойчивости к фитофторозу были отобраны 12 растений линии Кр6, часть которых характеризовалась наиболее ярким фенотипическим проявлением симптомов поражения *P. infestans*, а другая часть демонстрировала полное отсутствие поражения патогеном.

Амплификация выделенной ДНК из растений линии Кр6 с праймерами маркера TG328, ассоциированного с геном *Ph-3*, показала наличие фрагмента длиной 500 п.н. у всех исследованных растений (см. рис. 2а). Последующая обработка рестриктазой BstNI выявила наличие сайта рестрикции в амплифицированных фрагментах ДНК у растений Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3 и Кр6-4. В этих образцах присутствовал как фрагмент 500 п.н., так и фрагмент длиной 240–260 п.н. (см. рис. 2б).

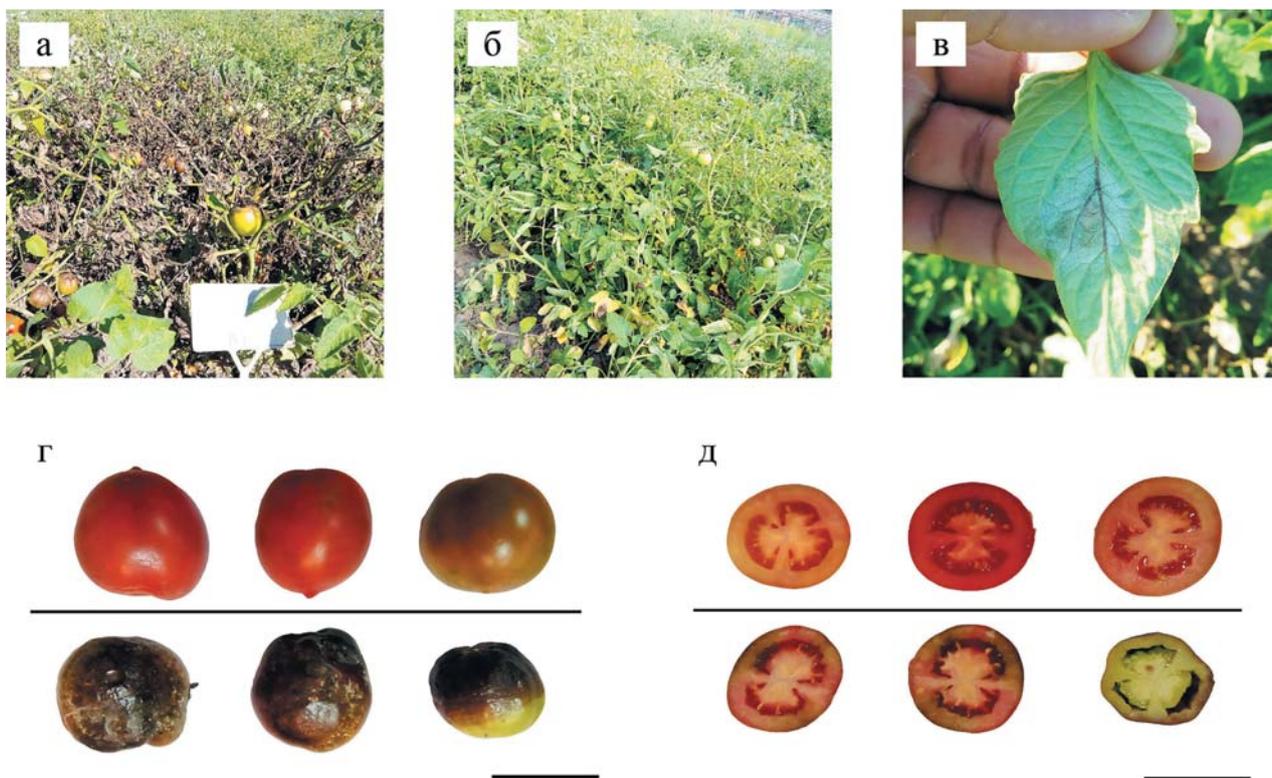


Рис. 1. Симптомы поражения фитофторозом растений томата. а – растения с симптомами поражения; б – растения без симптомов поражения; в – пораженные листья, г, д – пораженные фитофторозом плоды (снизу) и плоды без симптомов поражения (сверху). Размерные линейки: 5 см
Fig. 1. Symptoms of Late Blight of tomato plants. а – plants with disease symptoms; б – plants without symptoms; в – affected leaves, д, е – fruits affected by Late Blight (from below) and fruits without symptoms (from above). Size ranges: 5 cm

Таблица 1. Результаты фенотипической оценки коллекции образцов томата на устойчивость к фитофторозу на искусственном инфекционном фоне

Table 1. Results of a Late Blight disease assay of a collection of tomato accessions

Название линии	Общее число растений	Число растений		Соотношение растений с признаками поражения и без признаков поражения
		Без признаков поражения	С признаками поражения	
Кр1	24	0	24	-
Кр2	28	0	28	-
Кр4	32	24	8	3 : 1
Кр5	28	0	28	-
Кр6	28	18	10	1,8 : 1
Кр7	32	26	6	4,3 : 1
Кр8	24	0	24	-
Кр9	26	16	10	1,6 : 1
Кр10	32	20	12	1,67 : 1
Кр11	24	0	24	-
Кр12	27	17	10	1,7 : 1
Кр14	30	30	0	-

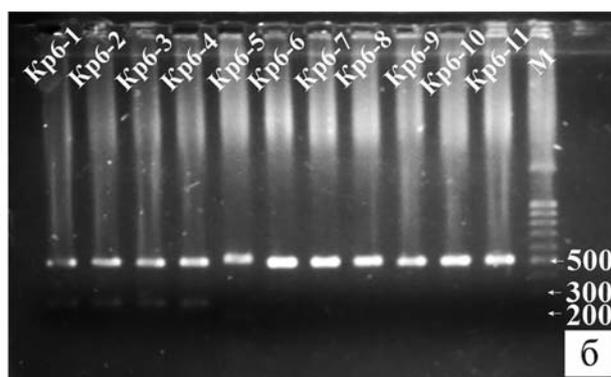
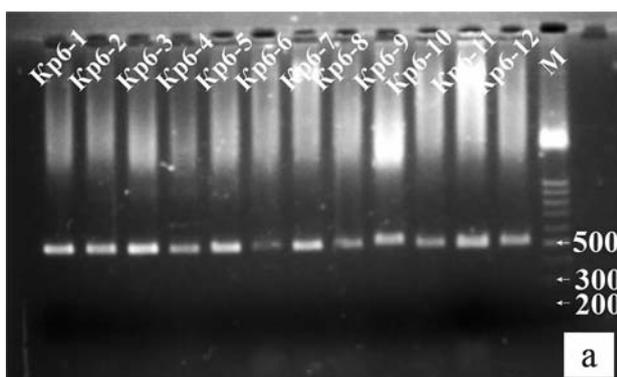


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического скрининга на присутствие маркера TG328 в линии Кр6. а – до обработки рестриктазой BstNI; б – после обработки рестриктазой BstNI. Сверху указаны номера образцов, справа отмечены длины фрагментов ДНК, М – маркер длин фрагментов ДНК

Fig. 2. Results of molecular genetic screening for the presence of the TG328 marker in the Kr6 line. a – before treatment with BstNI restrictase; b – after treatment with BstNI restrictase. The accession numbers are shown above, the lengths of DNA fragments are marked on the right, and M is a marker for the lengths of DNA fragments

ПЦР с праймерами маркера R1-1400, ассоциированного с геном R1, привела к получению двух фрагментов, длинами 1400 п.н. и 1000 п.н. (см. рис. 3а) у всех исследованных растений, кроме Кр6-3, Кр6-7 и Кр6-9. У

растения Кр6-3 выявлялся только фрагмент 1000 п.н. В то же время амплификация с праймерами маркера R1-1205 привела к получению фрагмента длиной около 190 п.н. (см. рис. 3б).

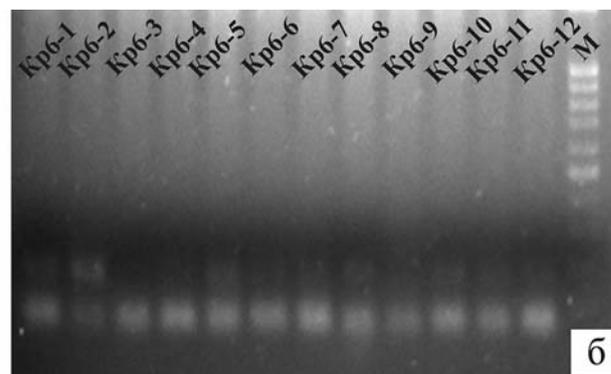
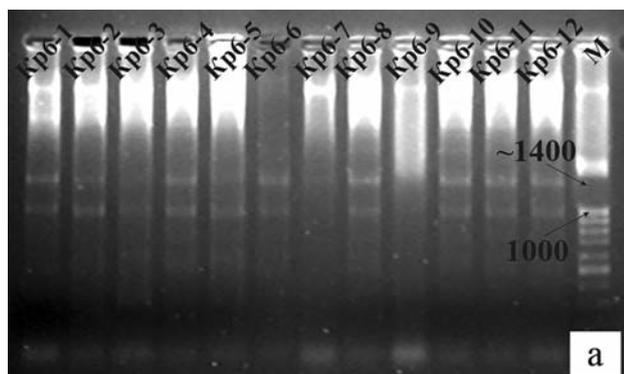


Рис. 3. Результаты молекулярно-генетического скрининга на присутствие маркеров R1-1400 (а) и R1-1205 (б) генов устойчивости к фитофторозу. Сверху указаны номера образцов, М – маркер длин фрагментов ДНК

Fig. 3. Results of molecular genetic screening for the presence of markers R1-1400 (a) and R1-1205 (b) of Late Blight resistance genes. The accession numbers are shown above, and M is a marker for the lengths of DNA fragments

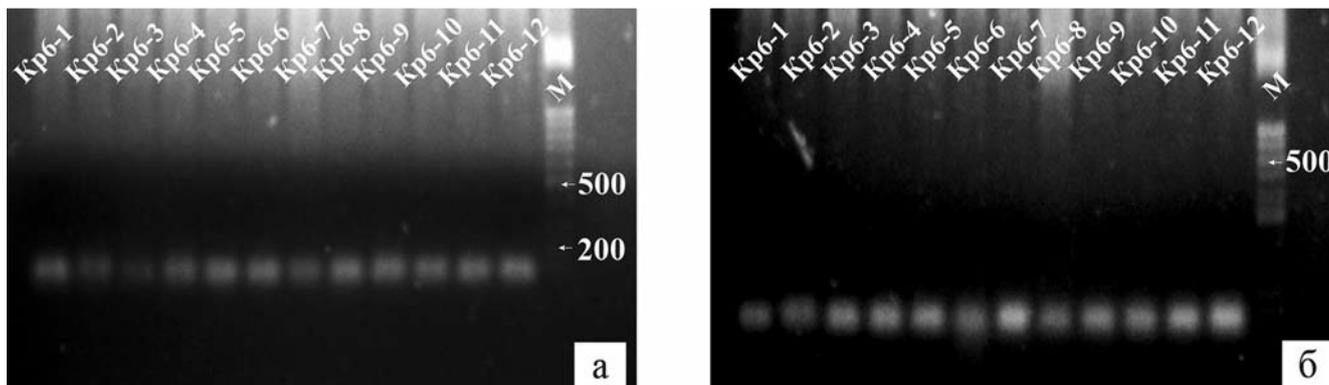


Рис. 4. Результаты молекулярно-генетического скрининга на присутствие маркеров R3-1380 (в), RT-R3a (г). Сверху указаны номера образцов, М – маркер длин фрагментов ДНК
Fig. 4. Results of molecular genetic screening for the presence of markers R3-1380 (b), RT-R3a (d). Accession numbers are indicated above, M is a marker for the lengths of DNA fragments

В результате амплификации ДНК с праймерами маркеров R3-1380 и RT-R3a целевых фрагментов обнаружено не было (см. рис. 4).

Обсуждение

Наши результаты показали, что ген устойчивости Ph-3 является доминантным. Эти результаты согласуются с результатами, полученными Hanson P. *et al.*, которые показали в 2016 г., что ген Ph-3 устойчивости к фитофторозу является доминантным [17]. Однако к концу вегетации количество полностью устойчивых растений в расщепленных популяциях снизилось у линий, полученных от гетерозиготных родителей типа Кр6. По нашему мнению, только линии, полученные от гомозиготных доминантных родителей, таких как линия Кр14, проявили полную устойчивость к фитофторозу. Из этих анализов следует, что эффект доминирования, наблюдаемый в этом гене, не является полным доминированием, а скорее неполным. Это подтверждает результаты, полученные в 2002 году Chunwongse J. *et al.*, показали, что этот ген Ph-3 представляет собой ген с неполным доминированием, но чья устойчивость превосходит таковую у генов Ph-1 и Ph-2 [3].

Наличие фрагмента размером 500 п.н. указывает на отсутствие сайта рестрикции на этом фрагменте. Эта последовательность соответствует рецессивному аллелю гена устойчивости Ph-3 к фитофторозу. Наличие фрагментов размером 240 /260 п.н. свидетельствует о существовании на этом фрагменте сайта рестрикции BstN1. Эта последовательность соответствует аллелю устойчивости. Эти два фрагмента примерно одинаковы по размерам и очень близки друг к другу (см. рис. 3). Аналогичные результаты были получены M. Mutschler и представлены R. Shekasteband *et al.*, в 2015 г., которые показали, что этот маркер не разделяет четко два фрагмента, образующихся в результате расщепления эндонуклеазой рестрикции [18]. Однако само наличие сайта рестрикции на этой последовательности гена свидетельствует об эффективности маркера в идентификации этого гена.

Растения Кр6-1, Кр6-2, Кр6-3 и Кр6-4 несут аллели устойчивости и восприимчивости гена Ph-3, поэтому имеют гетерозиготный генотип (P/T). С другой стороны, растения Кр6-5, Кр6-6, Кр6-7, Кр6-8, Кр6-9, Кр6-10, Кр6-11 и Кр6-12 являются двойными носителями восприимчивого аллеля гена Ph-3. Они имеют гомозиготный генотип (Т/Т). Хотя полная устойчивость была достигнута, когда ген Ph-3 был высоко экспрессирован под его нативным промотором, абсолютная корреляция между уровнем экспрессии гена и устойчивостью не была обнаружена.

Наличие дополнительных, еще не определенных гипотетических генов, необходимо для обеспечения полной устойчивости. Кроме того, было установлено, что существуют новые изоляты *P. infestans*, которые способны преодолеть ген устойчивости Ph-3 [17].

Образование нескольких продуктов в ПЦР реакции на наличие маркера R1-1400 может говорить о присутствии нескольких аллельных вариантов этого маркера, в одном из которых произошла делеция. Отсутствие других маркеров генов R1 и R3a можно связать с невозможностью применения этих маркеров для видов вне секции Petota, к которым относятся представители рода Solanum, образующие клубни.

Подтвержденная эффективность маркера TG328 в обнаружении гена Ph-3 устойчивости томата к фитофторозу является важным преимуществом, которое может быть использовано в будущих программах селекции томата на устойчивость к этому заболеванию. Однако следует подчеркнуть, что для эффективной борьбы со всеми расами этого заболевания необходимо создавать сорта томата, сочетающие в своем геноме гены Ph-2 и Ph-3, и по возможности другие гены устойчивости.

Заключение

Устойчивость растений томата к фитофторозу, являющегося одним из наиболее вредоносных заболеваний томата, в настоящее время может идентифицирован как на искусственном инфекционном фоне, так и с помощью молекулярных маркеров на известные гены устойчивости. Нами было показано, что маркер TG328 позволяет эффективно выявлять наличие гена Ph-3 у образцов исследованной генетической коллекции, которые могут быть в дальнейшем использованы в селекционных программах на устойчивость, основанных на использовании маркер-опосредованного отбора. Фенотипическая оценка устойчивости томата к фитофторозу на искусственном инфекционном фоне выявила 1 линию растений без симптомов поражения заболеванием, 5 линий растений, полностью пораженных фитофторозом, и 6 линий, в которых наблюдали расщепление по проявлению симптомов поражения. Молекулярно-генетическое исследование выявило, что устойчивые растения были гетерозиготами по гену Ph-3. Кроме того, большая часть исследованных растений имела ген R1, который, однако, при отсутствии гена Ph-3, не обеспечивал устойчивость растений к фитофторозу.

Таким образом, эти растения представляют ценный генетический материал для использования в селекционных программах на устойчивость томата к фитофторозу.

• Литература /References

1. Andrivon D. Biology, ecology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology*. 1995;85:1053-1056.
2. Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease*. 2012;96:1–17.
3. Chunwongse J., Chunwongse C., Black L., Hanson P. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 2002;77:281–286.
4. Poudel A., Pandey M., Shah K., Acharya B., Shrestha J. Evaluation of fungicides for management of late blight (*Phytophthora infestans*) of potato. *Agrica*. 2020;9(1):10–17. <https://doi.org/10.5958/2394-448X.2020.00004.8>
5. Mazumdar P., Singh P., Kethiravan D., Ramathani I., Ramakrishnan N. Late blight in tomato: insights into the pathogenesis of the aggressive pathogen *Phytophthora infestans* and future research priorities. *Planta*. 2021;253:119. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03636-x>
6. Wang Y.Y., Chen C.H., Hoffmann A., Hsu Y.C., Lu S.F., Wang J.F., Hanson P. Evaluation of the Ph-3 gene specific marker developed for marker assisted selection of late blight resistant tomato. *Plant Breeding*. 2016; 135(5):636-642. <https://doi.org/10.1111.pbr.12395>
7. Khavkin E., Sokolova E., Beketova M., Pankin A., Kuznetsova M., Kozlovskaya I., Spiglazova S., Statsyuk N., Yashina I., Potato resistance to late blight as related to the *R1* and *R3* genes introgressed from *S. demissum*. In: Schepers HTAM (ed.) PPO-Special Report no. 14. Wageningen, DLO Foundation. 2010. pp. 231-238.
8. Sokolova E., Pankin A., Beketova M., Rogozina E., Kuznetsova M., Spiglazova S., Yashina I., Khavkin E. SCAR markers of the R-genes and germplasm of wild *Solanum* species for breeding late blight-resistant potato cultivars. *Plant Genetic Resources*. 2011;9(2):309–312. <https://doi.org/10.1017/S1479262111000347>
9. Paluchowska P, 'Sliwka J, Yin Z. Late blight resistance genes in potato breeding. *Planta*. 2022;255(6):127.
10. Matson M.E.H., Liang Q., Lonardi S., Judelson H.S. Karyotype variation, spontaneous genome rearrangements affecting chemical insensitivity, and expression level polymorphisms in the plant pathogen *Phytophthora infestans* revealed using its first chromosome-scale assembly. *PLoS Pathog*. 2022;18(10):e1010869. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010869>
11. Merk H.L., Ashrafi H., Foolad M.R. Selective genotyping to identify late blight resistance genes in an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium*. *Euphytica*. 2012;187(1):63–75. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0729-6>
12. Robbins M.D., Masud M.A.T., Panthee D.R., Gardner R.G., Francis D.M., Stevens M.R. Marker-assisted selection for coupling phase resistance to Tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato. *Hortic. Sci.* 2010;45:1424–1428.
13. Doyle J. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W. (Eds). *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer. 1991. 283-293. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
14. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990;262:56–61.
15. Ballvora A., Ercolano M.R., Weiss J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J*. 2002;30(3):361-71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01292.x>
16. Huang, S., Van Der Vossen, E.A.G., Kuang, H., Vleeshouwers, V.G.A.A., Zhang, N., Borm, T.J.A., Van Eck, H.J., Baker, B., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *The Plant Journal*. 2005;42:251-261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x>
17. Hansona P., Lua S.-F., Wanga J.-F., Chena W., Kenyona L., Tana C.-W., Teeb K.L., Wanga Y.-Y., Hsua Y.-C., Schafleitnera R., Ledesmaa D., Yanga R.-Y. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*. 2016;201:346-354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
18. Shekasteband R., Hutton S.F., Scott J.W. Designing new DNA markers and determining the effective size of *Ph-2* and *Ph-3* introgressions for late blight resistance stacking purposes in tomato. *TGC REPORT*. 2015;65:22-31.

Об авторах:

Хунвану Виньну Никэз – аспирант кафедры ботаники, селекции и семеноводств садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА

имени К.А. Тимирязева, автор для переписки, hounvinic87@yahoo.com

Григорий Федорович Монахос – к.с.-х. н., генеральный директор ООО «Селекционная станция имени Н.Н. Тимофеева», SPIN-код: 3741-6845, <https://orcid.org/0000-0002-6603-6933>

Сократ Григорьевич Монахос – д.с.-х.н., профессор, заведующий кафедрой ботаники, селекции и семеноводства садовых растений, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, SPIN-код: 7130-9663, <https://orcid.org/0000-0001-9404-8862>, Researcher ID: L-5962-2013

About the Authors:

Nicaise V. Hounwanou – postgraduate student of the Department Botany, Plant Breeding and Seed Technology, Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Corresponding Author, hounvinic87@yahoo.com

Grigory F. Monakhos – Cand. Sci. (Agriculture), Director of the Breeding Station named after N.N. Timofeev, SPIN-code: 3741-6845, <https://orcid.org/0000-0002-6603-6933>

Sokrat G. Monakhos – Dr. Sci. (Agriculture), Professor, Head of the Botany, Plant Breeding and Seed Technology Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, SPIN-code: 7130-9663, <https://orcid.org/0000-0001-9404-8862>, Researcher ID: L-5962-2013