

УДК 577.2.08

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ВИНОГРАДА *Plasmopara viticola* НА ОСНОВЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР

© 2025 г. Н. Н. Нитяговский¹, А. А. Днепровская^{1,2}, А. А. Ананьев¹, К. В. Киселев¹,
О. А. Алейнова^{1,*}

¹Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, ДВО РАН,
Владивосток, 690022 Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Институт мирового океана, Владивосток, 690922 Россия

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 11.03.2024 г.

После доработки 19.07.2024 г.

Принята к публикации 05.09.2024 г.

Предложен новый метод ранней идентификации возбудителя ложной мучнистой росы винограда *Plasmopara viticola*, основанный на методе количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) с применением флуоресцентного красителя SYBR Green I. Разработаны шесть пар праймеров для ПЦР РВ для идентификации *P. viticola*, где пара праймеров PvITS1_2-*real-s/a* продемонстрировала наибольшую эффективность для раннего выявления ложной мучнистой росы винограда. Более того, была показана положительная корреляция ($R = 0.86$) при сравнении результатов ПЦР РВ с праймерами PvITS1_2-*real-s/a* с данными метатаксономического анализа по распространению *P. viticola* среди растений Дальневосточных видов и сортов винограда. Таким образом, ПЦР РВ с парой праймеров PvITS1_2-*real-s/a*, является дешевым и эффективным методом для раннего выявления и мониторинга бессимптомных инфекций *P. viticola*. Разработанный метод может послужить основой для прогнозирования эпидемий ложной мучнистой росы винограда и борьбы с ней на виноградниках.

Ключевые слова: стратегии управления заболеваниями растений, милдью, *Vitis amurensis*, NGS

DOI: 10.31857/S0555109925010075 **EDN:** CZWTZC

Plasmopara viticola (*P. viticola*, Berk. & M.A. Curtis; Berl. & De Toni) – облигатный патогенный оомицет, вызывающий ложную мучнистую росу винограда, является одним из наиболее опасных патогенов для виноградарства во всем мире [1]. *P. viticola* поражает молодые, зеленые листья и плодовые ткани винограда, вызывая серьезные потери урожая (40–90%) за короткие промежутки времени [2]. Этот патоген винограда способен пройти множество циклов заражения растения за один сезон роста при благоприятных погодных условиях, таких как высокое количество осадков и умеренные температуры. В результате высокой скорости спорообразования патогена, эпидемии ложной мучнистой росы, распространяющиеся на большие территории виноградников, могут начаться из спорадических очагов инфекции. Сле-

довательно, специфическое выявление *P. viticola* очень важно для прогнозирования заболевания и борьбы с ним.

К традиционным методам обнаружения ооспор *P. viticola* в листьях винограда относятся прямые микроскопические наблюдения листьев [3–6], и косвенная оценка с использованием биоанализа “плавающего диска листа винограда” (“floating grare leaf disc”), где фрагменты листьев, содержащие ооспоры, погружают в воду в присутствии не зараженных плавающих листовых дисков, таким образом зооспоры, происходящие из ооспор, вызывают инфекцию у здоровых листовых дисков, тяжесть которой пропорциональна количеству ооспор [7].

Традиционные методы оценки не позволяют количественно определить *P. viticola* в инфициро-

ванных образцах, особенно в образцах с низкой концентрацией патогена. В настоящее время существуют новые более эффективные подходы к идентификации оомицета *P. viticola* в тканях винограда: 1) спектрофотометрический метод для определения жизнеспособности спорангиев и зооспор оомицета *P. viticola* [8]; 2) нецелевой метаболомный подход (высокочувствительные методы на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением масс-спектрометрии, ВЭЖХ-МС), при котором происходит идентификация плазмоспецифичных липидных производных [9]; 3) молекулярные методы с высокой специфичностью и чувствительностью для количественного определения патогена, такие как количественная ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) [10–12] и метод петлевой изотермической амплификации (ПИА, или Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) [13]. Вальсеси с соавт. [11] разработали мультиплексный метод ПЦР РВ с использованием флуоресцентных зондов типа TaqMan для относительного количественного определения ДНК *P. viticola* непосредственно из листьев *Vitis vinifera*, где использовали праймеры, подобранные к участку последовательности внутреннего транскрибируемого спейсера 1 (*ITS1*) — 5.8S рДНК. Позднее, в работе Аммура с соавт. [10] использовали аналогичный анализ для количественного определения количества ДНК *P. viticola* в зараженных, стареющих листьях. Идентификация ложной мучнистой росы при помощи метода ПИА была разработана на основе последовательности *ITS1 P. viticola*, этот анализ обладал высокой чувствительностью и был способен обнаружить присутствие менее 33 фг геномной ДНК *P. viticola* на 25 мкл реакции в течение 30 мин [13]. Таким образом, все представленные методы в основном использовались для обнаружения *P. viticola* в листьях с симптомами ложной мучнистой росы, и не использовались для обнаружения *P. viticola* в бессимптомных листьях винограда.

Стоит отметить, что скорость проявления симптомов ложной мучнистой росы у внешне здоровых листьев после заражения *P. viticola* до сих пор неизвестна. Раннее определение патогена *P. viticola* у визуально здоровых растений винограда позволит своевременно применять методы борьбы с ложной мучнистой росой, что, безусловно, является ключевыми фактором для снижения риска потери урожая, а также ограничит обработку фунгицидами здоровых виноградных лоз, что в целом позволит снизить экологическую нагрузку сельского хозяйства на природную среду.

Цель данного исследования — разработка наиболее эффективной пары праймеров для молекулярно-количественного определения *P. viticola* во внешне здоровых, без проявлений симптомов ложной мучнистой росы, образцах винограда при помощи метода ПЦР РВ на основе флуоресцентного красителя SYBR Green I.

МЕТОДИКА

Растительный материал и условия поверхностной стерилизации. В июле 2022 года всего было собрано 19 образцов винограда (табл. 1). Все образцы, за исключением М-dm, выглядели здоровыми, без симптомов ложной мучнистой росы. С каждого растения мы отбирали минимум по 2 молодых побега и 2 листа.

Образцы винограда (листья и стебли) промывали под проточной водой с мылом (“Альтсепт М”, Россия). В асептических условиях взвешивали 0.2 г ткани каждого образца винограда. Затем образцы промывали в 70%-ном спирте в течение 2 мин, 1 мин в 10%-ном растворе пероксида водорода и стерильной водой 5 раз.

Выделение ДНК, подготовка библиотеки и секвенирование Illumina MiSeq. ДНК была выделена из 0.2 г поверхностно-стерилизованных образцов винограда, с использованием метода ЦТАБ-спин, как описано ранее [14]. Для высокопроизводительного секвенирования с использованием технологии Illumina первая техническая повторность образцов ДНК была отправлена в коммерческую организацию “Синтол” (Россия), как описано ранее [15], вторую техническую повторность образцов использовали для ПЦР РВ. Для определения качества и количества ДНК ее анализировали с помощью прибора Nanodrop-1000 (“Nanodrop”, США) и квантового флуорометра Quantus (“Promega”, США). Библиотеки были тщательно подготовлены к секвенированию в точном соответствии с протоколом, изложенным в руководстве “Подготовка библиотеки для метагеномного секвенирования 16S” (часть № 15,044,223 Rev. B; Illumina, США). Праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA-3') и ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') были использованы для амплификации участков рДНК *ITS1* грибов и грибоподобных организмов во всех образцах. Реагенты Nextera® XT Index Kit (“Illumina”, США) использовались для индексации ампликонов. Библиотечный пул подвергся секвенированию на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (“Illumina”, США). Считывание последовательностей ампликонов проводилось с обоих концов по 250 п.н.

Данные высокопроизводительного секвенирования были успешно депонированы в базу данных Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI, США) под регистрационными номерами PRJNA980748 и PRJNA998468 и в базе данных лаборатории биотехнологии Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Россия (<https://biosoil.ru/downloads/biotech/Metagenoms/>) [15].

Таблица 1. Образцы винограда, собранные в июле 2022 года

№	Сокращение	Местоположение
<i>Vitis amurensis</i>		
1	Gh	Теплица ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток
2	M	Плодовый питомник “Макаревич”, г. Уссурийск
3	M-dm	<i>V. amurensis</i> с видимыми симптомами <i>P. viticola</i> , “Макаревич”, г. Уссурийск
4	S-Va	Ботанический сад, г. Южно-Сахалинск
5	P-1	Пригород г. Владивостока
6	P-2	Пригород г. Владивостока
7	P-3	о. Русский, г. Владивосток
8	P-4	о. Рикорда, юг Приморского края
9	P-5	с. Ивановка, Приморский край
10	P-6	Верхне-Уссурийская научно-исследовательская станция ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
11	Kh-1	с. Литовко, юг Хабаровского края
12	Kh-2	Силинский лес, юг Хабаровского края
<i>Vitis coignetiae</i>		
13	S-1	Ботанический сад, г. Южно-Сахалинск
14	S-2	г. Холмск, о. Сахалин
15	S-3	г. Невельск, о. Сахалин
Сорта винограда из плодового питомника “Макаревич”		
16	Ad	<i>V. vinifera</i> × <i>V. amurensis</i> cv. Адель (гибрид No. 82-41 F ³)
17	Muk	<i>Vitis riparia</i> × <i>V. vinifera</i> cv. Мукузани (происхождение неизвестно)
Сорта винограда из коммерческого виноградника “PRIM ORGANICA”		
18	Alfa	<i>Vitis labrusca</i> × <i>V. riparia</i> cv. Альфа,
19	Pr-St	<i>Vitis</i> Elmer Swenson 2-7-13 cv. Прэйри Стар

Предварительную обработку полученных данных и таксономическую идентификацию последовательностей *ITS1* проводили, как описано в Нитяговский с соавт. [15].

Дизайн праймеров и количественный ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ). Для количественного анализа присутствия *P. viticola* в собранных образцах были разработаны шесть специфических пар праймеров в соответствии с биоинформатическим анализом и литературными данными. Дизайн праймеров выполняли с использованием инструмента Primer-BLAST [16] со следующими параметрами: длина ампликона 70–180 п.н., температура плавления (T_m) 59–62°C, содержание GC 50–60%, нацелены

только на последовательности *P. viticola*. Были использованы три специфические пары праймеров PvITS1_1-real-s/a, PvITS1_2-real-s/a (разработанные в этой статье) и Gior [10], предназначенные для амплификации *ITS1 P. viticola* (ГенБанк: ON183972.1); две специфические пары праймеров PvCox1_1-real-s/a, PvCox1_2-real-s/a для амплификации участка ДНК субъединицы цитохром С оксидазы I (Cox1) (ГенБанк: NC_045922.1, область от 12520 п.н. до 13998 п.н.); две специфические пары праймеров PvCox2_1-real-s/a и PvCox2_2-real-s/a для субъединицы цитохром С оксидазы II (Cox2) (ГенБанк: KP684906.1). Для детекции *P. viticola* был использован метод ПЦР РВ с генами *ITS1*, *Cox1* и *Cox2* в качестве целевых. Благодаря этим уникальным последовательностям ДНК была

достигнута необходимая точность определения *P. viticola* [17, 18]. Праймеры, используемые для ПЦР РВ представлены в табл. 2.

ПЦР РВ проводили с использованием дополнительных образцов ДНК (второй технической повторности), которые были извлечены ранее из тех же растений в то же время, но не отправлены для высокопроизводительного секвенирования (1–5 образцов для каждого растения винограда). ДНК амплифицировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1× Taq буфер с 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ дНТФ, 0.25 мкМ каждого из праймеров, 1× SybrGreen I, 1 ед. активности Taq ДНК полимеразы, 1 мкл ДНК. Реактивы для ПЦР РВ использовали от “Евроген” (Россия). Синтез геноспецифических праймеров заказывали в “Евроген” (Россия). Амплификацию проводили при следующих условиях: 2 мин при 95°C, затем 50 циклов 95°C 10 с и 62°C 25 с.

Для проведения ПЦР РВ использовали детектирующий амплификатор ДТ Прайм (“НПО ДНК-Технология”, Россия) с программным обеспечением RealTime_PCR v7.3. Для обчета

результатов амплификации использовали режим “количественного анализа со стандартами”. Данный режим анализа позволяет определить количество искомого фрагмента ДНК в образце за счет использования калибровочных образцов (стандарты, разведение ДНК из пробы “Mildew”). При наличии калибровочных образцов программа RealTime_PCR v7.3 автоматически строит калибровочную прямую и определяет концентрацию в анализируемых пробах.

В качестве стандартов была использована ДНК, выделенная из листа винограда *V. vinifera* с признаками ложной мучнистой росы, которую подтвердили специалисты из ФГБНУ “ФНЦ агробιο-технологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки” им. А.К. Чайки (Россия). Этот образец (Mildew) был получен в августе 2023 г. с Дальневосточной опытной станции филиала Института растениеводства им. Вавилова (Россия).

ДНК из образца Mildew была разведена стерильной водой до концентрации 20, 4, 0.8 и 0.16 нг/мкл и использована по 1 мкл на реакцию в качестве калибраторов в ПЦР РВ. Похожим образом про-

Таблица 2. Праймеры, используемые для ПЦР РВ для диагностики *P. viticola* в образцах винограда

Праймер	Последовательность праймера	Участок гена (№ в Ген-Банке)	Длина ампликона, п.н.	Tm, °C	GC**, %	Ссылка
PvITS1_1-real-s	5'-GGCGGTTGCAGCTAATGGAT-3'	<i>ITS1</i> (ON183972.1)	120	61.1	55	Данная статья
PvITS1_1-real-a	5'-AGCGAAGACTTTCGTCCTCACA-3'			61.9	50	
PvITS1_2-real-s	5'-CCACGTGAACCGTTTCAACCA-3'	<i>ITS1</i> (ON183972.1)	83	61.6	52.4	Данная статья
PvITS1_2-real-a	5'-CCATTAGCTGCAACCGCAA-3'			61.6	55	
Giop-F	5'-TCCTGCAATTCGCATTACGT-3'	<i>ITS1</i> (ON183972.1)	208	63.4	45	[10]
Giop-R	5'-GGTTGCAGCTAATGGATTCCSTA-3'			63.3	45.5	
PvCox1_1-real-s	5'-ACCTGTTCTAGCCGGTGCTATT-3'	<i>Cox1</i> (NC_045922.1 12520-13998)	90	61.5	50	Данная статья
PvCox1_1-real-a	5'-ACCGGATCACCACCTCCAGA-3'			62.5	60	
PvCox1_2-real-s	5'-GCGTGCTCCGGGTTTAAGTT-3'	<i>Cox1</i> (NC_045922.1 12520-13998)	105	61.2	55	Данная статья
PvCox1_2-real-a	5'-ATAGCACCGGCTAGAACAGG-3'			59.3	55	
PvCox2_1-real-s	5'-TGTTCCGGAAAGTGATTTAGCA-3'	<i>Cox2</i> (KP684906.1)	178	60.5	43.5	Данная статья
PvCox2_12-real-a	5'-TGATTTAAGCGGCCCGGACA-3'			62.2	55	
PvCox2_2-real-s	5'-CAGATGTTTTACACTCATGGGCGA-3'	<i>Cox2</i> (KP684906.1)	73	61.4	45.8	Данная статья
PvCox2_12-real-a	5'-TGATTTAAGCGGCCCGGACA-3'			62.2	55	

* Tm — температура плавления праймеров; GC — процентное содержание гуанина (G) и цитозина (C) в праймере.

водили ПЦР PB как с использованием праймеров к участкам последовательностей *P. viticola* (табл. 2), так и с использованием праймеров к генам “домашнего хозяйства винограда” *VaGAPDH* и *VaActin* [19]. Полученные таким образом значения уровня амплификации последовательностей *P. viticola* делили на значения, полученные для генов *VaGAPDH* и *VaActin* из соответствующих проб. Далее данные были представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка (SE) и обчислены с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Tukey HSD, выполненным с использованием R пакета Stats (<https://www.r-project.org>, дата обращения 6 марта 2024 г.) [20]. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. График корреляции Пирсона между данными ПЦР PB и метатаксономического анализа был получен с использованием R пакета ggpubr (дата обращения 6 марта 2024 г.) [21].

Для количественной оценки амплификации изучаемых последовательностей использовали шестнадцать технических повторов (восемь реакций ПЦР PB, нормализованных к участку гена *VaGAPDH* и восемь реакций ПЦР PB к *VaActin*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ эффективности применения ПЦР PB SYBR Green I для диагностики *Plasmopara viticola* в винограде. На основе литературных данных и с использованием биоинформатического анализа было разработано шесть пар праймеров для детекции *P. viticola* в образцах винограда. При анализе эффективности ПЦР PB только три специфические пары праймеров: PvITS1_1-real-s/a, PvITS1_2-real-s/a и PvCox1_1-real-s/a, имели эффективность близкую к 100% (табл. 3).

Сравнение данных ПЦР PB с ранее полученными данными высокопроизводительного секвенирования по относительной представленности *P. viticola* в образцах винограда. Образцы, собранные с тех же растений, но не отправленные для высокопроизводительного секвенирования, подвергали анализу ПЦР PB SYBR Green I на наличие патогена с использованием выбранных пар праймеров. Полученные данные ПЦР PB сравнивали с данными высокопроизводительного секвенирования, полученными ранее [15] (рис. 1). На 3 растениях (P-4, S-1, M-dm) методом ПЦР PB была выявлена относительно высокая средняя представленность патогена (5.5–61%), сопоставимая с данными, полученными в результате высокопроизводительного секвенирования. Согласно данным ПЦР PB, относительный уровень количества ампликонов в пробах, где использовалась ДНК винограда с видимыми симптомами ложной мучнистой росы винограда (M-dm), был выше (за исключением PvCox1_1) по сравнению с другими образцами

растений без видимых симптомов (рис. 1а). В 15 пробах, где в качестве матрицы была использована ДНК образцов винограда Gh-1, P-1, P-2, P-3, P-5, P-6, Kh-1, Kh-2, S-Va, S-2, S-3, Ad, Muk, Alfa, Pr-St относительный уровень амплификации ампликонов *P. viticola* с использованием праймеров PvITS1_2-real-s/a и PvCox1_1-real-s/a по данным ПЦР PB не отличался от отрицательного контроля. Из них у 11 пробах (Gh-1, P-1, P-2, P-3, P-5, P-6, Kh-1, S-Va, S-2, Alfa, Pr-St) уровень амплификации ПЦР PB соответствовал отсутствию или низкой средней представленности патогена (0–1%) по данным метатаксономического анализа. В 4 пробах (Kh-2, S-3, Ad, Muk) результаты ПЦР PB не согласовывались с методом высокопроизводительного секвенирования. Эти результаты могли быть связаны с крайне неравномерным распределением патогена внутри растения, поскольку мы провели ПЦР PB на резервных образцах винограда, которые не были отправлены для высокопроизводительного секвенирования (рис. 1).

Средний уровень амплификации ПЦР PB с использованием праймеров PvITS1_1-real-s/a, PvITS1_2-real-s/a и PvCox1_1-real-s/a в резервной копии образцов ДНК винограда имел высокую корреляцию со средней относительной представленностью *ITS1 P. viticola* по данным высокопроизводительного секвенирования (рис. 2). Уровень коэффициента корреляции Пирсона между оценками среднего относительного уровня амплификации по данным ПЦР PB и средней относительной представленности *P. viticola* в образцах NGS был самым высоким для амплификации с использованием праймеров PvITS1_2-real-s/a ($R = 0.86, p < 0.001$) (рис. 2).

Специфическое выявление фитопатогенов сельскохозяйственных культур очень важно для прогнозирования очагов заболевания и борьбы с ними. В статье предложен более чувствительный и дешевый метод диагностики с использованием ПЦР PB на основе флуоресцентного красителя SYBR Green I, а также разработано 6 пар праймеров ПЦР PB (табл. 2). Согласно результатам эффективности ПЦР PB, наиболее эффективными праймерами были PvITS1_1-real-s/a, PvITS1_2-real-s/a и PvCox1_1-real-s/a (табл. 3). Кроме того, коэффициент корреляции Пирсона был самым высоким, когда использовались праймеры PvITS1_2-real-s/a (рис. 2). Таким образом, данные ПЦР PB подтвердили результаты высокопроизводительного секвенирования, где наибольшая представленность *P. viticola*, в дополнение к образцам винограда с видимыми симптомами ложной мучнистой росы, была обнаружена в образцах винограда, собранные на о. Рикорд и в ботаническом саду на о. Сахалин (рис. 1). Кроме того, был проведен анализ стоимости детекции *P. viticola* в образцах винограда с помощью ПЦР PB, метагеномного анализа и ПИА. Учитывая затраты на необходимые расходные

Таблица 3. Эффективность праймеров, используемых для ПЦР РВ для диагностики *P. viticola* в образцах винограда

Название праймеров	Эффективность ПЦР РВ, %	C _t для I и IV стандартов	C _t для Nc
PvITS1_1-real-s	98 ± 4	15.8–22.8	–
PvITS1_1-real-a			
PvITS1_2-real-s	102 ± 6	15.2–22.2	27.8
PvITS1_2-real-a			
Giop-F	154 ± 14	35.7–42.8	43.8
Giop-R			
PvCox1_1-real-s	107 ± 7	16.8–23.5	33.8
PvCox1_1-real-a			
PvCox1_2-real-s	124 ± 11	17.9–24.9	28.6
PvCox1_2-real-a			
PvCox2_1-real-s	85 ± 6	23.0–29.7	34.6
PvCox2_12-real-a			
PvCox2_2-real-s	112 ± 7	19.2–25.6	33.4
PvCox2_12-real-a			

Примечание: C_t — пороговый цикл; стандарты I–IV — серия 5-кратных разведений ДНК (20, 4, 0.8 и 0.16 нг на пробу) из листьев *V. vinifera* с симптомами ложной мучнистой росы; Nc — отрицательный контроль.

материалы, приобретенные на российском рынке, предполагаемые затраты на анализ одного образца винограда с использованием ПЦР РВ составили 500 рублей, в то время как использование высокопроизводительного секвенирования на базе Illumina составило 6000 рублей. Ранее сообщалось, что стоимость метода ПИА составляло примерно 650 рублей за один образец [22]. Следовательно, разработанные праймеры для ранней детекции *P. viticola* представляют весьма выгодную альтернативу методам NGS и ПИА.

Разработанный в этом исследовании количественный метод, основанный на ПЦР РВ модификации SYBR Green I, имеет также большие преимущества по сравнению с традиционными визуальными анализами и анализами *in vitro*, требующими относительно много времени, но позволяют быстро с высокой точностью определить количество патогена в винограде. Применение метода ранней диагностики *P. viticola* на виноградниках Дальнего востока России, где относительно высокая влажность и умеренные температуры создают благоприятные условия для размножения данного оомицета [23], может позволить детектировать данный патоген до появления первых симптомов, что в целом снизит серьезность эпидемии в период вегетации. Предложенный метод целесообразно применять за пару недель до потенциальной

вспышки милдью и, в первую очередь, анализировать подверженные ложной мучнистой росе сорта винограда. Для более точной диагностики рекомендуется использовать 2 листа и 2 молодых побега винограда на одну виноградную лозу, чтобы исключить неравномерное распределение патогена внутри растения. Более того, мы столкнулись с тем, что многие зараженные растения, не имели симптомов поражения милдью. Также симптомы ложной мучнистой росы схожи с другими болезнями винограда, например оидиумом, но эти болезни требуют разных методов лечения. Кроме того, информация об отсутствии *P. viticola* у бессимптомных растений позволит избежать дополнительной превентивной обработки химическими реагентами, что также благоприятно скажется на качестве урожая и будет экономически оправдано.

Таким образом, применение разработанного метода ранней детекции *P. viticola* на основе ПЦР РВ может предоставить полезную информацию для руководства по применению фунгицидов и потенциально повысить эффективность борьбы с ложной мучнистой росой на виноградниках.

В работе разработан относительно дешевый и эффективный метод ранней диагностики возбудителя ложной мучнистой росы винограда

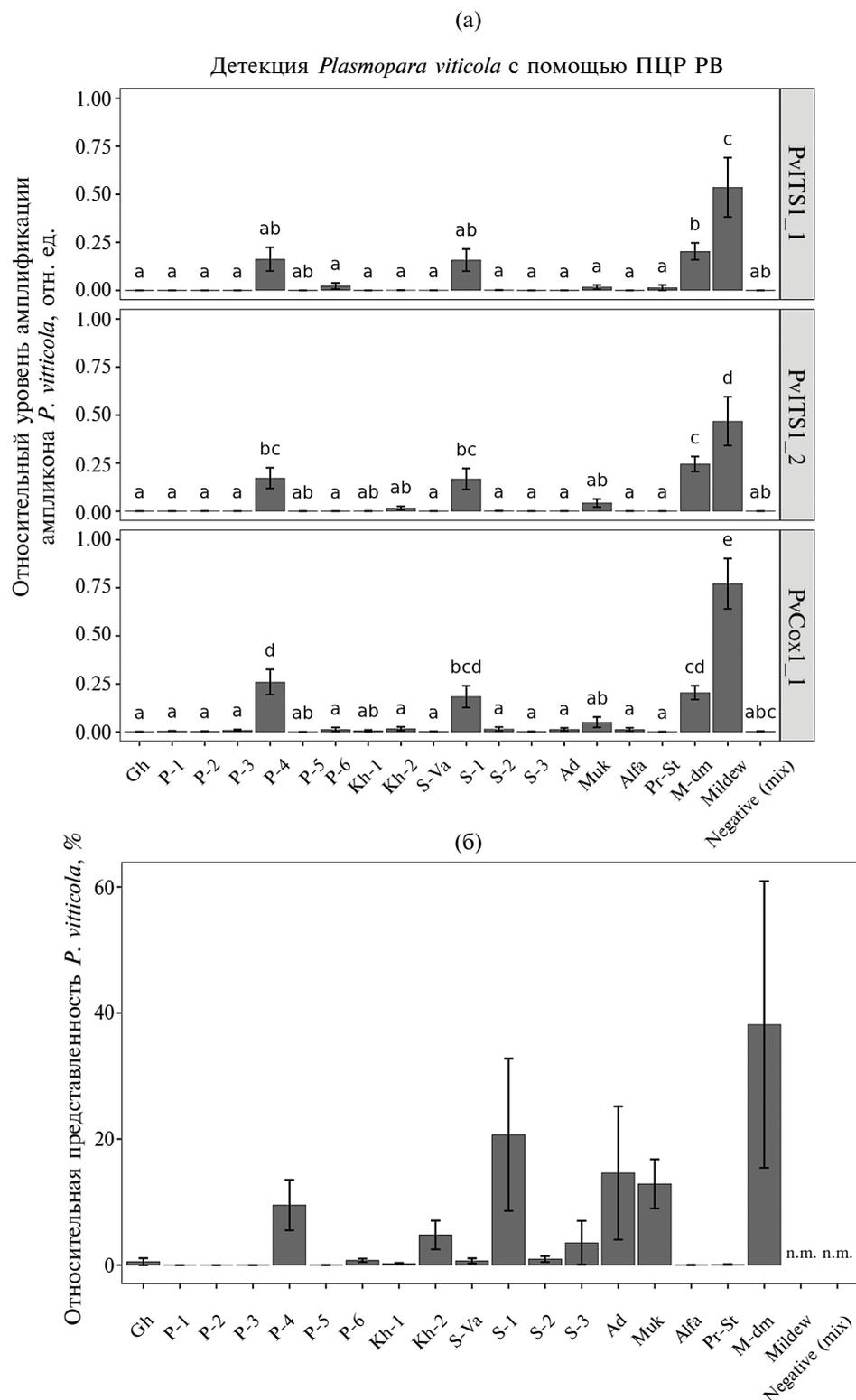


Рис. 1. Количественное определение амплификации участков последовательностей PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 в образцах ДНК винограда, выполненное методом ПЦР РВ (а); относительная представленность *P. viticola* в образцах NGS (б). Происхождение всех проб указано в табл. 1. Nc — реакция ПЦР РВ без ДНК винограда. n.m. — не измерялась. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE (объединенные данные по образцам листьев и стеблей одного растения). Средние значения на каждой цифре, за которой следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки.

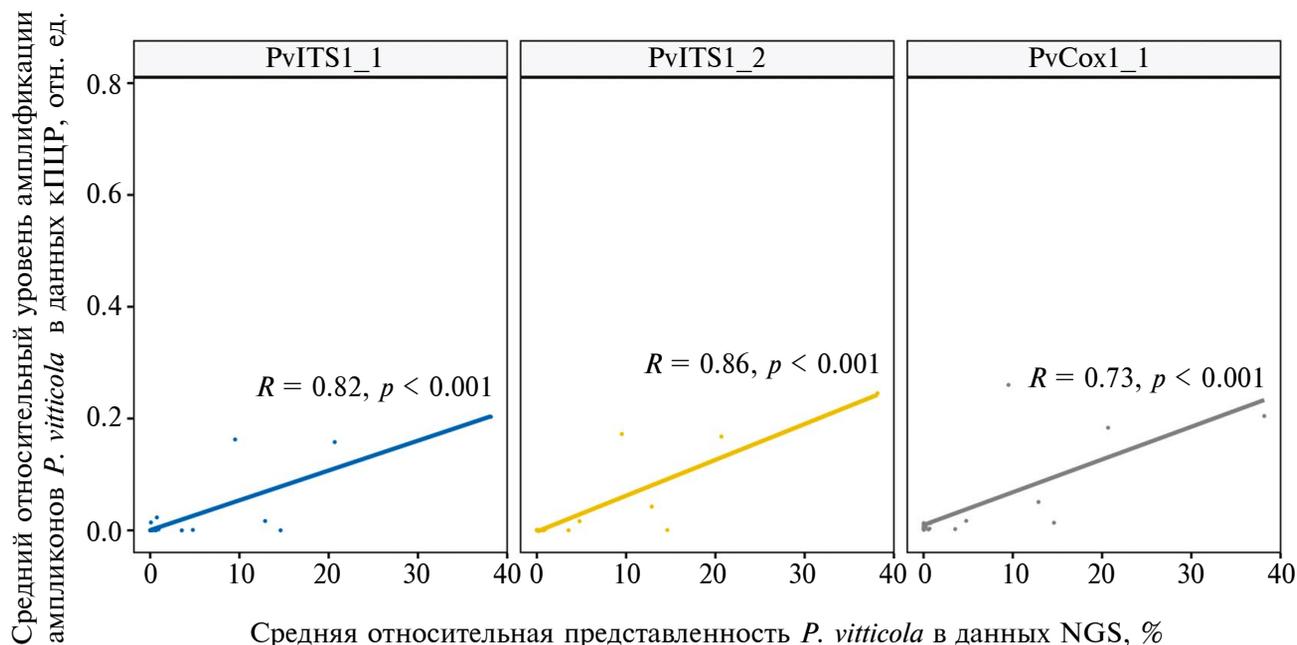


Рис. 2. Определение коэффициента корреляции Пирсона взаимосвязи между оценками относительного уровня амплификации по данным ПЦР ПВ (отн. ед.) и относительной представленностью ампликонов *ITS1 P. viticola* в образцах NGS: 1, 2, 3 – линии линейной регрессии для ампликонов PvITS1_1, PvITS1_2 и PvCox1_1 соответственно.

P. viticola на основе количественного метода ПЦР ПВ модификации SYBR Green I. Эффективность данного метода подтверждена полученными ранее данными высокопроизводительного секвенирования по технологии Illumina, где была обнаружена линейная зависимость корреляции полученных данных. Применение данного метода может быть полезно в качестве диагностического инструмента для выявления *P. viticola* и борьбы с ложной мучнистой росой на коммерческих виноградниках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10001, <https://rscf.ru/project/22-74-10001>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koledenkova K., Esmaeel Q., Jacquard C., Nowak J., Clément C., Ait Barka E. // *Frontiers in Microbiology*. 2022. V. 13. P. 889472.
2. Toffolatti S.L., Russo G., Campia P., Bianco P.A., Borsa P., Coatti M., Torriani S.F., Sierotzki H. // *Pest Management Science*. 2018. V. 74. № 12. P. 2822–2834.
3. Toffolatti S.L., Serrati L., Sierotzki H., Gisi U., Vercesi A. // *Pest Management Science*. 2007. V. 63. № 2. P. 194–201.
4. Burruano S. // *Mycologist*. 2000. V. 14. № 4. P. 179–182.
5. Díez-Navajas A.M., Greif C., Poutaraud A., Merdinoglu D. // *Micron*. 2007. V. 38. № 6. P. 680–683.
6. Vercesi A., Sirtori C., Vavassori A., Setti E., Liberati D. // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2000. V. 38. № 1. P. 109–112.
7. Vercesi A., Toffolatti S.L., Zocchi G., Guglielmann R., Ironi L. // *Eur J Plant Pathol*. 2010. V. 128. № 1. P. 113–126.
8. Hong C.-F., Scherm H. // *Journal of Phytopathology*. 2020. V. 168. № 5. P. 297–302.
9. Negrel L., Halter D., Wiedemann-Merdinoglu S., Rustenholz C., Merdinoglu D., Hugueney P., Baltenweck R. // *Frontiers in Plant Science*. 2018. V. 9. P. 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00360>
10. Si Ammour M., Bove F., Toffolatti S.L., Rossi V. // *Frontiers in Plant Science*. 2020. V. 11. P. 1202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01202>

11. *Valsesia G., Gobbin D., Patocchi A., Vecchione A., Pertot I., Gessler C.* // *Phytopathology*. 2005. V. 95. № 6. P. 672–678.
12. *Yang L., Chu B., Jie D., Yuan K., Sun Q., Jiang C., Ma Z.* // *Phytopathology Research*. 2023. V. 5. № 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1186/s42483-023-00178-w>
13. *Kong X., Qin W., Huang X., Kong F., Schoen C.D., Feng J. et al.* // *Sci Rep. Nature Publishing Group*, 2016. V. 6. № 1. P. 28935.
<https://doi.org/10.1038/srep28935>
14. *Kiselev K.V., Nityagovsky N.N., Aleynova O.A.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. № 3. P. 361–367.
15. *Nityagovsky N.N., Ananev A.A., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Dneprovskaya A.A., Tyunin A.P. et al.* // *Horticulturae*. 2024. V. 10. № 4. P. 326.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae10040326>
16. *Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L.* // *BMC Bioinformatics*. 2012. V. 13. № 1. P. 134.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
17. *Robideau G.P., De COCK A.W. a. M., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H., Bala K. et al.* // *Molecular Ecology Resources*. 2011. V. 11. № 6. P. 1002–1011.
18. *Choi Y.-J., Beakes G., Glockling S., Kruse J., Nam B., Nigrelli L. et al.* // *Molecular Ecology Resources*. 2015. V. 15. № 6. P. 1275–1288.
19. *Kiselev K.V., Aleynova O.A., Grigorchuk V.P., Dubrovina A.S.* // *Planta*. 2017. V. 245. № 1. P. 151–159.
20. *R Core Team* // *R Foundation for Statistical Computing*. 2021.
<https://www.r-project.org/>
21. *Kassambara A.* // *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots. R package*. 2023.
<https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>
22. *Lou D., Meurer M., Ovchinnikova S., Burk R., Denzler A., Herbst K. et al.* // *EMBO reports*. 2023. V. 24. № 5. P. e57162.
<https://doi.org/10.15252/embr.202357162>
23. *Mouafu-Tchinda R.A., Beaulieu C., Fall M.L., Carisse O.* // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2021. V. 43. № 1. P. 73–87.

Identification of the Causal Agent of Downy Mildew of *Plasmopara viticola* Grapes by Quantitative PCR

N. N. Nityagovsky^a, A. A. Dneprovskaya^{a,b}, A. A. Ananev^a, K. V. Kiselev^a, and O. A. Aleynova^{a,*}

^a*Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia*

^b*Far Eastern Federal University, Institute of the World Ocean, Vladivostok, 690922 Russia*

*e-mail: aleynova@biosoil.ru

A new method is proposed for the early diagnosis of the causal agent of grapes downy mildew, *Plasmopara viticola*, based on the method of quantitative real-time PCR (qPCR RT) using SYBR Green I fluorescence. Six pairs primers were developed for the diagnosis of *P. viticola*, among the designed primers, PvITS1_2-real-s/a demonstrated the highest effectiveness for early detection of grapevine downy mildew with a strong positive correlation with the metagenomic data of *P. viticola* distribution in Far Eastern grape species and varieties, where a linear dependence was found ($R^2 = 0.86$). Thus, qPCR RT of PvITS1_2 can be used for early detection and monitoring of asymptomatic *P. viticola* infections. The developed method can be used as a basis for predicting epidemics of downy mildew of grapes and for its control in vineyards.

Keywords: plant disease management, downy mildew, *Vitis amurensis*, NGS