

УДК 634.8: 632.4: 575.174.015.3

UDC 634.8: 632.4: 575.174.015.3

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-41-50

DOI 10.30679/2219-5335-2019-6-60-41-50

**АПРОБАЦИЯ
ДНК-МАРКЕРОВ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗНООБРАЗИЯ
ПАТОГЕНА *PLASMOPARA VITICOLA* ***

**APPROBATION OF DNA MARKERS
FOR THE STUDY
OF *PLASMOPARA VITICOLA*
PATHOGEN'S DIVERSITY**

Макаркина Марина Викторовна
младший научный сотрудник
лаборатории сортоизучения
и селекции винограда
e-mail: konec_citatu@mail.ru

Makarkina Marina Victorovna
Junior Research Associate
of Laboratory of Cultivar's Study
and Breeding of Grapes
e-mail: konec_citatu@mail.ru

Ильницкая Елена Тарасовна
канд. биол. наук
зав. лабораторией сортоизучения
и селекции винограда
e-mail: ilnitskaya79@mail.ru

Ilnitskaya Elena Tarasovna
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory of Cultivar's study
and Breeding of Grapes
e-mail: ilnitskaya79@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
научный сотрудник
лаборатории
селекционно-биотехнологической
e-mail: ad-a-m@mail.ru

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci.
Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory
e-mail: ad-a-m@mail.ru

Лободина Елена Вадимовна
аспирант
младший научный сотрудник
лаборатории
селекционно-биотехнологической
e-mail: Alyona2255@yandex.ru

Lobodina Elena Vadimovna
Post-graduate student
Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory
e-mail: Alyona2255@yandex.ru

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

*Federal State Scientific
Budget Institution
«North-Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Winemaking»,
Krasnodar, Russia*

Оомицет *Plasmopara viticola* вызывает одно из наиболее вредоносных заболеваний винограда – милдью. В районах влажного климата Черноморского побережья Северного Кавказа патоген причиняет особый ущерб. В виде эпифитотии

Oomycete *Plasmopara viticola* causes one of the most harmful diseases of grapes – downy mildew. In the areas of the humid climate of the Black Sea coast of the North Caucasus, the pathogen causes particular damage. In the form of epiphytotic,

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 19-416-233038 p_мол_a.

Plasmopara viticola развивается 6-7 раз за 10 лет и может вызывать потери от 50 до 100 % урожая текущего года, несмотря на наличие большого числа фунгицидов, способных сдерживать вредоносность этого заболевания. Цель работы – апробация микросателлитных ДНК маркеров GOB, CES, ISA и BER для изучения разнообразия популяций *P. viticola*, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края. Материалом для исследования служили виноградные листья различных сортов, поражённые милдью. Листья отобраны в мае-июле 2019 г. в различных точках Краснодарского края. ДНК *P. viticola* выделяли из поражённой ткани виноградных листьев набором «ЦитоСорб», разработанным компанией «Синтол» специально для диагностики фитопатогенов. Всего экстрагировано 8 образцов ДНК *P. viticola*. Исследование выполнено методом полимеразной цепной реакции с оптимизацией количества и длительности циклов, а также концентрации реагентов. Размер амплифицированных фрагментов локусов GOB, CES, ISA и BER оценивали с помощью автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 методом фрагментного анализа. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1. Наибольший полиморфизм выявлен по маркеру GOB (15 типов аллелей в восьми исследуемых образцах). Маркеры GOB, CES, ISA и BER могут быть использованы для изучения популяций *P. viticola*, распространённых на виноградниках Краснодарского края.

Ключевые слова: ВИНОГРАД, МИЛДЬЮ, *PLASMOPARA VITICOLA*, ДНК-МАРКЕРЫ

Plasmopara viticola develops 6-7 times of 10 years and can cause the losses from 50 to 100 % of yield, despite the presence of a large number of fungicides that can inhibit the harmfulness of this disease. The aim of the work was to test the microsatellite DNA markers of GOB, CES, ISA, and BER to study the diversity of *P. viticola* populations parasitizing in vineyards of the Krasnodar Territory. The material for the study were grape leaves of various varieties affected by mildew. The leaves were taken in May-July 2019 at various points in the Krasnodar Territory. *P. viticola* DNA was isolated from the diseased tissue of grape leaves using the «CytoSorb» developed by «Syntol» specifically for the diagnosis of phytopathogens. A total of 8 samples of *P. viticola* DNA were extracted. The study was carried out using the classical method of polymerase chain reaction with optimization of the number and duration of cycles, as well as the concentration of reagents. The size of the amplified fragments of the GOB, CES, ISA, and BER loci was estimated using an ABI Prism 3130 automated genetic analyzer and using fragment analysis. Data analysis was carried out in the program Gene Mapper 4.1. The greatest polymorphism was detected by the GOB marker (15 types of alleles in eight studied samples). The GOB, CES, ISA, and BER markers can be used to study *P. viticola* populations wide spreading in the vineyards of the Krasnodar Territory.

Key words: GRAPEVINE, DOWNY MILDEW, *PLASMOPARA VITICOLA*, DNA MARKERS

Введение. Милдью (ложная мучнистая роса) – одно из наиболее вредоносных заболеваний винограда, возбудителем которого является *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et de Toni, представляющий собой гетероталлический диплоидный, облигатный биотрофный оомицет [1]. Патоген

имеет узкую специализацию – поражает только виноград: развивается на всех зеленых органах виноградной лозы – листьях, побегах, соцветиях, ягодах, усиках. *P. viticola* является эндемиком для диких видов *Vitis* Северной Америки. В Европе заболевание впервые было отмечено в 1878 году. Вероятно, оно было ввезено в Европу американскими виноградными черенками, используемыми для замены французских виноградников, разрушенных филлоксерой. В новых экологических условиях болезнь стала причинять огромный ущерб высококачественным, но неустойчивым к милдью европейским сортам винограда [2].

В районах влажного климата черноморского побережья Северного Кавказа милдью причиняет особый ущерб [3]. В виде эпифитотии болезнь развивается 6-7 раз за 10 лет и может вызывать потери от 50 до 100 % урожая текущего года, несмотря на наличие большого числа фунгицидов, способных сдерживать вредоносность этого заболевания. Эпифитотийному развитию милдью способствуют частые дожди, туманы, росы и поливы. В случае сильного поражения виноградных растений милдью наблюдается снижение урожайности и в следующем году, вследствие общего ослабления растений снижается зимостойкость кустов [4].

Классификация патогена несколько раз пересматривалась. В 1834 году возбудитель милдью был впервые выявлен Schweinitz в северо-восточной части США и был классифицирован как гриб *Botrytis cana* Link. В 1848 году Berkley и Curtis переклассифицировали его в новый вид *Botrytis viticola*. В 1876 году De Vary описал бесполое и половые стадии патогена и поместил его в род *Peronospora*, как *Peronospora viticola*. Только через 20 лет Schröter (1886), используя четкие различия между несколькими популяциями *Peronospora*, разделил этот род на два – *Peronospora* и *Plasmopara*.

В дальнейшем Berlese и de Toni (1888), используя систему классификации Schröter, переименовали этот микроорганизм в *Plasmopara viticola* [2].

Очередной пересмотр классификации окончательно переместил оомицетов из Царства Грибов в Гетероконидии, признав их тесную связь с фотосинтезирующими организмами, такими как бурые и диатомовые водоросли [5].

В настоящее время в мире проводить точную идентификацию и изучать разнообразие различных организмов принято с использованием молекулярно-генетических методов. RAPD были первым типом маркеров, используемых для идентификации *P. viticola*. Хотя возможности этого типа маркеров ограничены, RAPD можно использовать для обнаружения генетических различий между генотипами в одном сравнительном эксперименте [6-8]. В 1998 году I. Kump и соавторы сообщили о высоком уровне изменчивости между партиями спорангий, собранных с отдельных листьев с одиночными пятнами поражения на винограднике в северной Швейцарии [7].

Важным шагом вперед стала разработка в 2003 году D. Gobbin и соавторами микросателлитных (SSR) маркеров – BER, ISA, CES, REX, GOB, которые достаточно специфичны, чтобы противостоять контаминации образцов любым количеством чужеродной ДНК и выявлять различия между генотипами оомицетов [9]. Представленные SSR-маркеры выявили различные степени полиморфизма в образцах из 190 маслянистых пятен (симптомы болезни), собранных на зараженных виноградниках Италии. Самый полиморфный маркер – GOB показал 43 аллеля, тогда как CES, ISA, BER и REX показали 14, 4, 3 и 1 аллель, соответственно [9]. В этой же работе был представлен метод экстракции ДНК с высокой пропускной способностью, который позволяет провести молекулярный анализ патогена непосредственно с листа хозяина.

В 2006 году Rumbou et al., пользуясь SSR-маркерами сконструированными D. Gobbin и соавторами, изучали разнообразие популяций *P. viticola*, собранных с трёх островов в Ионическом море к западу от Греции. Было

установлено, что популяции *P. viticola* из ранее изученных районов материка имеют высокое генетическое разнообразие и ограниченную клональность, однако популяции в условиях средиземноморских островов в основном характеризовались ограниченными вариациями, а эпидемии в основном были вызваны множественными клональными инфекциями одного или нескольких генотипов.

Популяции с разных островов отличались друг от друга, в то время как генетическая дивергенция также была обнаружена среди субпопуляций одного и того же участка [10, 11]. Кроме того, ряд исследований популяций *P. viticola* в Европе [10, 12-16], США [17], Южной Африке [18] показали высокое разнообразие патогена в разные периоды вегетации виноградного растения. В Австралии, напротив, генетическая изменчивость этого оомицета настолько низкая, что ооспоры были обнаружены только в 1 из 16 обследованных виноградников [19].

Цель данной работы – апробация микросателлитных ДНК маркеров GOB, CES, ISA и BER для изучения разнообразия популяций *P. viticola*, паразитирующих на виноградниках Краснодарского края.

Объекты и методы исследований. Для апробации маркеров GOB, CES, ISA и BER (табл. 1) материалом для исследования выступали виноградные листья различных сортов (Августин, Кунлеань, Кишмиш лучистый, Кишмиш венгерский, Кишмиш круглый, Ванесса Сидлесс), пораженные милдью, в активной фазе – с признаками спороношения. Сбор проведён в мае-июле 2019 года в различных точках Краснодарского края – ст. Курчанская Темрюкского района, окрестностях г. Анапа и г. Краснодара.

ДНК *P. viticola* выделяли непосредственно из пораженной ткани виноградных листьев набором «ЦитоСорб/CytoSorb», разработанным ООО «Синтол» (Москва) специально для диагностики фитопатогенов. Всего экстрагировано 8 образцов ДНК *P. viticola*.

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов, используемые в работе

Маркер	Последовательность олигонуклеотидов 5' → 3'	Флуоресцентная метка
GOB	F: CTTGGAAGTTATACCATGCTACC R: ATCGCACAGCTTAATGCATATC	FAM
CES	F: CTTGTCTGGTAGGTAAGCGTG R: CATCAGAATGTTTGTGTGTG	FAM
ISA	F: GGCATGGACGTTGACTCAC R: GAGAAGTTCCGCCAAGTACA	HEX
BER	F: AATGCAATGGTCTTCATCTCG R: CTCTGCGGTAAAAGCCTGTC	ROX

Исследование выполнено классическим методом полимеразной цепной реакции с оптимизацией количества и длительности циклов, а также концентрации реагентов с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Размер амплифицированных фрагментов локусов GOB, CES, ISA и BER оценивали с помощью автоматического генетического анализатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Фостер Сити, США) методом фрагментного анализа. Обработку данных осуществляли в программе Gene Mapper 4.1.

Обсуждение результатов. Апробированы ДНК-маркеры GOB, CES, ISA и BER, рекомендованные для изучения разнообразия популяций *P. viticola*, разработанные D. Gobbin и соавторами и усовершенствованные S.L. Matasci [9, 20]. Для этой цели были оптимизированы условия ПЦР-реакции: 3 минуты при 95 °C – начальная денатурация, далее 35 циклов: 20 секунд при 95 °C – денатурация, 30 секунд при 60 °C – отжиг праймеров, 40 секунд при 72 °C – элонгация; далее 5 минуты при 72 °C – финальная элонгация. В состав ПЦР-смеси общим объёмом 25 мкл

входило: 50-70 нг ДНК, 1х ПЦР-буфер для Таq-полимеразы с сульфатом аммония и магнием; 0,125 мМ/мкл dNTP, 0,25 пМ/мкл каждого праймера; 0,05 % БСА (бычий сывороточный альбумин); 0,125 е.а/мкл Таq-полимераза (ООО «СибЭнзим-М», Новосибирск).

ДНК-маркер GOB выявил 15 аллелей разного размера, CES – 4, ISA – 1, BER – 2. Идентифицированные аллели представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты ПЦР анализа

Сорт/место сбора	Выявленные аллели, пары нуклеотидов			
	GOB	CES	ISA	BER
Кунлеань, Темрюкский р-н, ст. Курчанская	281/285	151/154	134	124/137
Августин, Темрюкский р-н, ст. Курчанская	293/366/383	151/154	134	124/137
Бианка, Темрюкский р-н, ст. Курчанская	366/375	151	134	124/137
Кишмиш венгерский, г. Краснодар	314/375	149/151	134	124/137
Августин, г. Краснодар	198/293/302/371	154/156	134	124/137
Кишмиш лучистый, г. Анапа	285/302/375/379	151/156	134	124/137
Кишмиш круглый, г. Анапа	198/277/289/375	151	134	124/137
Ванесса сидлес, г. Анапа	194/281/306/366	151/154	134	124/137

При изучении даже ограниченного количества образцов можно заключить, что наиболее полиморфным маркером является GOB (рис.), в меньшей степени – CES. Маркеры ISA и BER не выявили полиморфизма в исследуемой выборке. Полученные данные о полиморфизме маркеров соответствуют данным из литературных источников [9, 10].

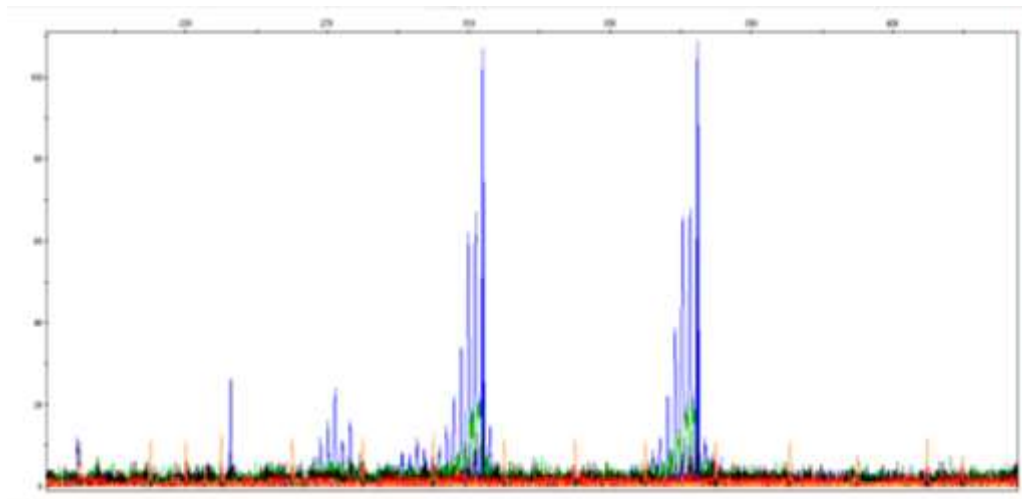


Рис. Результаты фрагментного анализа с маркером GOB

Какой-либо зависимости между значениями идентифицированных аллелей и местом сбора образцов не было выявлено, однако данная цель в настоящей работе не была поставлена. Подобная корреляция, либо её отсутствие, будет изучена в дальнейшем на большей выборке образцов.

Заключение. Апробированы ДНК-маркеры, рекомендованные для генотипирования *P. viticola*: GOB, CES, ISA и BER. Получены ПЦР-продукты, соответствующие целевому диапазону. Наибольший полиморфизм выявлен по маркеру GOB (15 типов аллелей в восьми исследуемых образцах). Таким образом, маркеры GOB, CES, ISA и BER могут быть использованы для изучения популяций *P. viticola*, распространённых на виноградниках Краснодарского края.

Литература

1. Wong F.P., Wilcox W.F. Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola* // Plant Disease. 2000. Vol. 84. P. 275-281.
2. Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management // Phytopathologia Mediterranea. 2011. Vol. 50(1). P. 3-44.
3. Евдокимова Е.А., Тосунова И.В. Патогены виноградной лозы – их опасность и методы снижения вредоносности [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2010. № 3(2). С. 68–86. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/02/10.pdf>. (дата обращения: 29.10.2019).
4. Талаш А.И. Защита винограда от болезней и вредителей. Краснодар: ФГБНУ СКЗНИИСИВ, 2015. 299 с.

5. Van der Auwera G.D.B.R., Van de Peer Y, De Rijk P., Van den Broeck I., De Wachter R. The phylogeny of the *Hyphochytriomycota* as deduced from ribosomal rDNA sequences of *Hyphochytrium catenoides* // *Molecular Biology and Evolution*. 1995. Vol. 12. P. 671-678.
6. Kump I., Blaise P., Gessler C. The use of RAPD-markers to estimate genetic diversity of *Plasmopara viticola* in a single vineyard // Third int. workshop on grapevine downy and powdery Mildew-Book of abstracts. – Sardy, 1998. P. 23.
7. Kump I., Gessler C., Blaise P. Primary infections of *Plasmopara viticola*: should we revise our ideas about the quantitative relevance of oospores? // *Bulletin OILB/SROP*. 1998. Vol. 21(2). P. 9-11.
8. Stark-Urnau M., Seidel M., Kast W.K., Gemmrich A.R. Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR // *Vitis*. 2000. Vol. 39(4). P. 163-166.
9. Gobbin D., Pertot I., Gessler C. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis // *European Journal of Plant Pathology*. 2003. Vol. 109. P. 153-164.
10. Rumbou A., Gessler C. Genetic dissection of *Plasmopara viticola* population from a Greek vineyard in two consecutive years // *European Journal of Plant Pathology*. 2004. Vol. 110. P. 379-392.
11. Rumbou A., Gessler C. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions // *Phytopathology*. 2006. Vol. 96. P. 501-509.
12. Gobbin D., Valsesia G., Gessler C. Genetic variability of *Plasmopara viticola* between and within selected populations // *Bulletin OILB/SROP* 2001. Vol. 24(7). P. 19-23.
13. Rumbou A., Gessler C. Greek epidemics of grapevine downy mildew are driven by local oosporic inoculum: a population biology approach // *Journal of Biological Research*. 2007. Vol. 7. P. 3-18.
14. Gobbin D., Jermini M., Loskill B., Pertot I., Raynal M., Gessler C. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew // *Plant Pathology*. 2005. Vol. 54. P. 522-534.
15. Gobbin D., Rumbou A., Linde C.C., Gessler C. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards // *Molecular Plant Pathology*. 2006. Vol. 7. P. 519-531.
16. Loskill B., Gobbin D., Berkelmann-Lochnertz B., Gessler C. Disease dynamics and genetic variability of *Plasmopara viticola* in three untreated vineyards // *Bulletin OILB/SROP*. 2006. Vol. 29 (11). P. 33-36.
17. Kennelly M.M., Gadoury D.M., Wilcox W.F., Magarey P.A. and Seem R.C. Primary infection, lesion productivity and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* // *Phytopathology*. 2007. Vol. 97. P. 512-522.
18. Koopman T., Linde C.C., Fourie P.H., McLeod A. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. *Molecular Plant Pathology*. 2007. Vol. 8. P. 723-736.
19. Killigrew B.X., Sivasithamparam K., Scott E.S. Absence of oospores of downy mildew of grape caused by *Plasmopara viticola* as the source of primary inoculum in most Western Australian vineyards // *Plant Disease*. 2005. Vol. 89. P. 777.
20. Gómez Zeledón J. J. *Plasmopara viticola*, the downy mildew of grapevine: phenotypic and molecular characterization of single sporangium strains infecting hosts with different resistance levels // PhD thesis. 2015. 123 p.

References

1. Wong F.P., Wilcox W.F. Distribution of baseline sensitivities to azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola* // *Plant Disease*. 2000. Vol. 84. P. 275-281.
2. Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management // *Phytopathologia Mediterranea*. 2011. Vol. 50(1). P. 3-44.

3. Evdokimova E.A., Tosunova I.V. Patogeny vinogradnoj lozy – ih opasnost' i metody snizheniya vredonosnosti [Elektronnyj resurs] // Plodovodstvo i vinogradarstvo Yuga Rossii. 2010. № 3(2). S. 68–86. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/10/02/10.pdf>. (data obrashcheniya: 29.10.2019).
4. Talash A.I. Zashchita vinograda ot boleznej i vreditelej. Krasnodar: FGBNU SKZNIISiV, 2015. 299 s.
5. Van der Auwera G.D.B.R., Van de Peer Y, De Rijk P., Van den Broeck I., De Wachter R. The phylogeny of the Hyphochytriomycota as deduced from ribosomal rDNA sequences of *Hyphochytrium catenoides* // *Molecular Biology and Evolution*. 1995. Vol. 12. P. 671-678.
6. Kump I., Blaise P., Gessler C. The use of RAPD-markers to estimate genetic diversity of *Plasmopara viticola* in a single vineyard // Third int. workshop on grapevine downy and powdery Mildew-Book of abstracts. – Sardy, 1998. P. 23.
7. Kump I., Gessler C., Blaise P. Primary infections of *Plasmopara viticola*: should we revise our ideas about the quantitative relevance of oo-spores? // *Bulletin OILB/SROP*. 1998. Vol. 21(2). P. 9-11.
8. Stark-Urnau M., Seidel M., Kast W.K., Gemmrich A.R. Studies on the genetic diversity of primary and secondary infections of *Plasmopara viticola* using RAPD/PCR // *Vitis*. 2000. Vol. 39(4). P. 163-166.
9. Gobbin D., Pertot I., Gessler C. Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis // *European Journal of Plant Pathology*. 2003. Vol. 109. P. 153-164.
10. Rumbou A., Gessler C. Genetic dissection of *Plasmopara viticola* population from a Greek vineyard in two consecutive years // *European Journal of Plant Pathology*. 2004. Vol. 110. P. 379-392.
11. Rumbou A., Gessler C. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions // *Phytopathology*. 2006. Vol. 96. P. 501-509.
12. Gobbin D., Valsesia G., Gessler C. Genetic variability of *Plasmopara viticola* between and within selected populations // *Bulletin OILB/SROP* 2001. Vol. 24(7). P. 19-23.
13. Rumbou A., Gessler C. Greek epidemics of grapevine downy mildew are driven by local oosporic inoculum: a population biology approach // *Journal of Biological Research*. 2007. Vol. 7. P. 3-18.
14. Gobbin D., Jermini M., Loskill B., Pertot I., Raynal M., Gessler C. Importance of secondary inoculum of *Plasmopara viticola* to epidemics of grapevine downy mildew // *Plant Pathology*. 2005. Vol. 54. P. 522-534.
15. Gobbin D., Rumbou A., Linde C.C., Gessler C. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards // *Molecular Plant Pathology*. 2006. Vol. 7. P. 519-531.
16. Loskill B., Gobbin D., Berkelmann-Lochnertz B., Gessler C. Disease dynamics and genetic variability of *Plasmopara viticola* in three un-treated vineyards // *Bulletin OILB/SROP*. 2006. Vol. 29 (11). P. 33-36.
17. Kennelly M.M., Gadoury D.M., Wilcox W.F., Magarey P.A. and Seem R.C. Primary infection, lesion productivity and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* // *Phytopathology*. 2007. Vol. 97. P. 512-522.
18. Koopman T., Linde C.C., Fourie P.H., McLeod A. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* in the Western Cape Province of South Africa. *Molecular Plant Pathology*. 2007. Vol. 8. P. 723-736.
19. Killigrew B.X., Sivasithamparam K., Scott E.S. Absence of oo-spores of downy mildew of grape caused by *Plasmopara viticola* as the source of primary inoculum in most Western Australian vineyards // *Plant Disease*. 2005. Vol. 89. P. 777.
20. Matasci C. L., Jermini M., Gobbin D., Gessler C. Microsatellite based population structure of *Plasmopara viticola* at single vine scale // *European journal of plant pathology*. 2010. Vol. 127(4). P. 501-508.