

УДК / UDC 632

**ФИТОПЛАЗМЕННЫЕ БОЛЕЗНИ ДЕРЕВЬЕВ И КУСТАРНИКОВ В ПАРКАХ
ЮЖНОБЕРЕЖНОГО КРЫМА**
PHYTOPLASMA DISEASES OF TREES AND SHRUBS IN THE PARKS
OF THE SOUTH COAST OF CRIMEA

Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Богоутдинов Д.З.

Kastalyeva T.B., Girsova N.V., Bogoutdinov D.Z.

**Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии,
Московская область, Россия**

All Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow Region, Russia

*E-mail: kastalyeva@vniif.ru

АННОТАЦИЯ

В 2012 г. из листьев трех видов древесных пород (ясень ланцетолистный, лавровишня камелиевидная и самшит вечнозеленый), собранных в парках Южнобережного Крыма и имевших симптомы фитоплазменной инфекции была выделена фитоплазма, принадлежащая к группе 16SrIII. Однако в последующие годы (2013-2016) не удавалось обнаружить фитоплазму в тех же растениях, несмотря на то, что симптомы болезни на ясене и самшите неуклонно усугублялись, приводя к отмиранию части растения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Фитоплазма, древесные породы, парк, Крым.

В бывшем СССР фитоплазменная болезнь под названием «столбур» была впервые отмечена в Крыму в 1929 году на томатах. В 1934 году была показана ее инфекционная природа, однако возбудителя долгое время выделить не могли, хотя было принято считать, что он имеет вирусную природу [1]. Был найден переносчик болезни, но патоген еще десятилетия оставался неизвестным [2]. Наконец, в 1967 г. после публикации статей японских исследователей, научная общественность узнала, что болезнь вызывает ранее неизвестный патоген растений — лишенная клеточной стенки бактерия класса Mollicutes [3]. По некоторому сходству с микоплазмами, возбудителями болезни животных, она получила название «микоплазмopodobный организм» — МПО, а в дальнейшем была переименована в фитоплазму [IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group (IRPCM, 2004)].

В 2012 г., когда группа вирусологии ВНИИФ работала над проектом «Вироидные и фитоплазменные болезни, влияющие на производство картофеля в России», собирались различные растения с признаками, сходными с симптомами фитоплазменного инфицирования, в нашей стране, а, если удавалось, то и за рубежом. В Крыму, который тогда принадлежал Украине, наше внимание привлекло весьма удручающее состояние парка санатория Дюльбер. Парк, окружавший великолепный дворец, принадлежавший прежде одному из представителей царской династии Романовых, великому князю Петру Николаевичу, переживал не лучшие свои времена, особенно растения, располагавшиеся вблизи береговой линии. Тогда в парке санатория Дюльбер, а также в Никитском ботаническом саду было собрано несколько образцов растений, в трех из них удалось обнаружить фитоплазму, принадлежавшую к группе 16SrIII.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы древесных и кустарниковых растений с изменениями вегетативных и генеративных органов, похожими на симптомы, характерные для инфицирования

фитоплазмами, собирали в парках Южнобережного Крыма (ЮБК) в 2012-2016 гг. Из листьев вырезали центральную и боковые жилки, мелко нарезали, замораживали и хранили при -20°C до момента выделения ДНК. Для выделения ДНК к 0,3 г. растительной ткани приливали 3 мл СТАВ (0,1 М трис-НСI буфер, содержащий 2,5% цетилтриметиламмония бромистого, 1,4 М хлористого натрия, 0,05 М ЭДТА, (рН 8,0), нагретого до 65°C и инкубировали при 60°C 16 час. Затем содержимое пробирки переливали в стерильную фарфоровую ступку и растирали; 1 мл взвеси центрифугировали в эппендорфовой пробирке 2 мин при $2400 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. К 500 мкл супернатанта добавляли 4 мкл РНКазы А (100 мг/мл) инкубировали при 65°C 10 мин и помещали на лед для охлаждения на 2 мин. Добавляли равный объем смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24:1). Перемешивали, медленно переворачивая пробирку 18-20 раз. Центрифугировали 5 мин при $8000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. К надосадочной жидкости добавляли 1 объем холодного изопропанола и выдерживали 10 мин при -20°C . Центрифугировали 10 мин при $13000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Осадок растворяли в 300 мкл ТЕ буфера и ДНК вновь осаждали двумя объемами холодного 95%-го этанола. Инкубировали 10 мин при -20°C . Центрифугировали 10 мин при $13000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$. Растворяли в 300 мкл ТЕ буфера. Осаждение этанолом повторяли. После центрифугирования осадок промывали 500 мкл 75%-го холодного этанола и вновь центрифугировали. Конечный осадок растворяли в 100 мкл ТЕ буфера.

Для выявления фитоплазмы в образцах тотальной ДНК растений использовали последовательно две ПЦР: прямую с парой праймеров P1/R16-SR и «вложенную», т.е. ПЦР-продукт прямой реакции служил в качестве матрицы во второй «вложенной», или «нестед» ПЦР с парой праймеров R16F2n/ R16R2 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые фитоплазма была обнаружена в 2012 г. в образце ясеня ланцетовидного, собранного в парке санатория «Дюльбер». Листья дерева были сложены в виде лодочки по центральной жилке, что могло указывать на инфицирование фитоплазмой. Из этого образца была выделена ДНК фитоплазмы. ПДРФ-анализ показал принадлежность ее к группе 16SrIII (группа пролиферации клевера по номенклатуре, основанной на нуклеотидной последовательности гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК). Было и другое изменение листа — вздутая центральная жилка. Разрастание жилок — симптом вовсе не характерный для фитоплазменного инфицирования, оно могло быть вызвано галлицами. Их отсутствие при вскрытии, означало, что личинки открылись и вылетели,

В дальнейшем нам удавалось собрать образцы с этого дерева весной 2013 г., осенью 2014 г. и весной 2015 г. Однако попытки обнаружить фитоплазму не дали результата, а к весне 2016 г. ветки с симптомами полностью погибли — потеряли листву и засохли. В то же время, молодые деревья с абсолютно такими же симптомами появились в другой части парка, но в образцах, с них собранных, также не удалось обнаружить фитоплазму. В связи с этим хотелось бы вспомнить работы американских исследователей 1995-1996 гг., в которых при изучении фитоплазменных болезней различных видов ясеня и сирени авторы отмечали тот факт, что фитоплазмы часто обнаруживаются в деревьях, которые выглядят здоровыми и не обнаруживаются в больных [5, 6].

В том же, 2012 году, фитоплазма группы 16SrIII была обнаружена и в лавровишне камелиевидной из Никитского ботанического сада. Это растение, листовая пластинка которого стянута, как бы «присборена» вдоль центральной жилки, по мнению специалистов, представляет собой форму лавровишни камелиевидной и имеет менее или более изогнутые листья в зависимости от года. Несмотря на то, что образцы с этого растения были собраны и проанализированы также в 2013, 2014, 2015 и 2016 гг., наличие фитоплазмы показано только в 2012 г.

Наконец, третьим растением из Никитского ботанического сада, из которого была выделена фитоплазма группы 16SrIII в 2012 г., был самшит вечнозеленый с

симптомами побеления листьев. Он растет вблизи лавровишни камелиевидной. За ним мы также вели наблюдение на протяжении пяти-шести лет. За это время его декоративность сильно пострадала. Если в 2012 году лишь небольшое количество веточек имело пеструю бело-зеленую окраску, то к 2017 году на кустах появились большие белые проплешины. Однако, как и в описанных выше случаях, идентифицировать наличие фитоплазмы в последующие годы не удавалось.

В 2014, 2015 и 2016 гг. парках ЮБК (санаторий «Дюльбер», сан.«Россия», парк «Мисхор», парк Ливадийского дворца, парк Воронцовского дворца) были собраны и проверены на наличие фитоплазмы образцы следующих деревьев и кустарников: бирючина блестящая, бобовник анагировидный (золотой дождь), глициния китайская, жимолость обыкновенная, кампсис, кизильник, лавровишня лекарственная, роза Леди Бэнкс, рябина крымская, сирень обыкновенная, фисташка туполистная. Однако ни в одном образце фитоплазма не была обнаружена, несмотря на то, что все они имели симптомы фитоплазменной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученный с помощью ПЦР отрицательный результат молекулярной диагностики фитоплазм, с одной стороны, показывает, что визуальная оценка по симптомам не всегда является достоверной, а, с другой стороны, может быть связан с тем, что стандартная процедура подготовки образцов для анализа оказалась не вполне пригодна для древесных растений. Кроме того, можно предположить, что существует и какая-то более глубокая причина, связанная с особенностями самой фитоплазменной инфекции и ее распределением в различных частях древесных растений.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Рыжков В.Л., Корачевский И.К. Вирусные болезни помидоров в опытах по искусственному заражению. В сб.: Вирусные болезни в Крыму и на Украине / Под ред. В.Л. Рыжкова. Симферополь, 1934: 7-30.
2. Сухов К.С., Вовк А.М. Цикадка *Hyalesthes obsoletus* Sign., переносчик столбура пасленовых. Доклады АН СССР. 1946. 53 (2): 153-156.
3. Doi Y., Teranaka M., Yora K. and Asuyama H. Mycoplasma or PLT Grouplike Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows or Pawlownia Witches' Broom. Japanese Journal of Phytopathology, 1967, 33, 259-266. <http://dx.doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>
4. Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E., Davis, R. E., & Bartoszyk, I. M. (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 1153–1169.
5. Sinclair, W.A., Griffiths, H.M. Epidemiology of a slow-decline phytoplasmal disease: Ash yellows on old-field sites in New York State. Phytopathology. 1995. Vol. 85. P. 123-128.
6. Sinclair, W.A., Griffiths, H.M., David R.E. Ash yellows and lilac witches'-Broom: Phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulture. Plant Disease. Vol. 80. P. 468-475.