

УДК 632:633.3

ФИТОПЛАЗМОЗЫ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙН.В. ГИРСОВА¹, Т.Б. КАСТАЛЬЕВА¹, Ю.И. МЕШКОВ¹,
К.А. МОЖАЕВА¹, Д.З. БОГОУТДИНОВ²

(¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии;
² Самарская государственная сельскохозяйственная академия)

Определены возбудители фитоплазмозов двадцати двух видов культурных и дикорастущих растений семейства Fabaceae, собранных в 2009–2013 гг. в четырех экономических регионах РФ: Северном, Центральном, Поволжском и Западно-Сибирском. Идентифицированы фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам и пяти подгруппам: 16SrI-A и C, 16SrIII-B, 16SrVI-A и 16SrXII-A. Исследован видовой состав насекомых отряда Hemiptera, подотряда Auchenorrhyncha, обитающих на бобовых травах в Московской области, выявлены виды насекомых, носителей и возможных переносчиков фитоплазменной инфекции.

Ключевые слова: бобовые растения, фитоплазменные болезни, краевое пожелтение клевера, пролиферация клевера, филлодия клевера, ведьмина метла люцерны, таксономическая принадлежность фитоплазм, цикадовые — переносчики фитоплазм.

Бобовые растения — ценные продовольственные и кормовые культуры. Они способны обогащать почву биологическим азотом, улучшать ее агрофизические и фитосанитарные свойства. Многие виды бобовых являются хорошими медоносами и привлекают энтомофагов. Древесные и кустарниковые виды отличаются декоративностью и адаптивностью к разным почвенно-климатическим условиям. Они широко используются при конструировании лесополос и городских насаждений. Возделывание бобовых увеличивает биоразнообразие агробиогеоценозов, определяя их устойчивую экономическую и экологическую эффективность.

Одним из факторов, значительно снижающих продуктивность бобовых культур, таких, как клевер и люцерна, и приводящих к потере декоративности и жизнеспособности древесных и кустарниковых видов, являются заболевания, вызванные фитоплазмами — бактериями, лишенными клеточных стенок. Фитоплазмы относятся к классу *Mollicutes*, паразитируют, как правило, в клетках флоэмы, обладают широким кругом хозяев и переносятся насекомыми из отряда Hemiptera с колюще-сосущим ротовым аппаратом.

Болезни, возбудители которых в настоящее время носят название «фитоплазмы», а ранее (с 1967 по 1994 гг.) назывались «микоплазмоподобные организмы», известны в бывшем СССР с конца 1920 — начала 1930 гг. как болезни пасленовых

культур, но тогда эти заболевания считались, вирусными. Ранние сообщения о подобных болезнях бобовых датируются концом 1940 — началом 1960 гг. [10, 12, 15]. В последующие годы фитоплазменные заболевания люцерны — карликовость и «ведьмина метла» — были признаны экономически значимыми в Казахстане, Киргизии и Поволжье РФ [3, 5, 8, 9, 11, 14, 16].

Фитоплазмы — облигатные паразиты, они не могут расти на питательных средах, поэтому к ним неприменимы постулаты Коха. Единственным биологическим тестом, подтверждающим наличие инфекции, может служить передача болезни от больного растения к здоровому (растению-индикатору) посредством прививки, насекомого-переносчика или паразитического растения повилики. Однако это трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому диагностика, как правило, делалась на основании симптомов. С начала 1990 гг. благодаря использованию специфических праймеров появилась возможность быстро и надежно определять наличие фитоплазм в тканях растений путем амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) гена 16S рибосомальной РНК [24, 25]. Была разработана классификация фитоплазм на основе анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) ПЦР-продуктов этого гена, которая к настоящему времени включает в себя более 30 групп.

Группы фитоплазм принято обозначать аббревиатурой 16Sr и соответствующей римской цифрой: например, 16SrI, 16SrII и т.д. Внутри групп фитоплазм различают подгруппы, при этом к обозначению группы добавляется прописная латинская буква: 16SrI-A, 16SrI-B и т.д. Кроме того, для подгрупп существует особое обозначение — аббревиатура от названия болезни того вида растения, на котором это заболевание и соответствующая подгруппа фитоплазм впервые были обнаружены, например, болезнь клевера, вызванная фитоплазмой из подгруппы 16SrI-C, называется «филлодия клевера» (Clover phyllody) и обозначается буквами CPh [23, 24, 32, 34].

В настоящей работе представлены данные, полученные в 2009–2013 гг., по определению и идентификации фитоплазм в культурных и дикорастущих бобовых растениях, имевших симптомы заражения фитоплазмами. Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Международного научно-технического центра проекта 3468р.

Методика

Из листьев растений, имевших симптомы инфицирования фитоплазмами, вырезали и замораживали жилки, из которых затем выделяли ДНК с помощью коммерческих наборов фирмы Qiagen (DNeasy Plant Mini Kit) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенную ДНК анализировали, как описано ранее [7].

Насекомые-переносчики фитоплазм отряда Полужесткокрылые (Hemiptera) подотряда Цикадовые, или шеехоботные (Auchenorrhyncha), были собраны в окрестностях ВНИИФ (Московская область) на куртинах лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus* L.), люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina* L.), клевера гибридного (*Trifolium hybridum* L.) и клевера лугового (*T. pratense* L.) в июле-августе 2010 г., а на двух последних видах — и в 2012 г. каждые две-три недели с июня по август. Численность цикадовых учитывали методом кошения энтомологическим сачком. Насекомых фиксировали 70%-ным этанолом, а затем классифицировали по видам с использованием определителя насекомых. Суммарную нуклеиновую кислоту из насекомых экстрагировали по методу Tanne et al. [30] с небольшими модификациями. Каждую

особь отдельно растирали в фарфоровой ступке с 0,5 мл буфера (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2% СТАВ; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 0,2% 2-меркаптоэтанол). Гомогенат переносили в микроцентрифужные пробирки и инкубировали 20 мин. при 60°C. После центрифугирования при 5000 мин.⁻¹ 10 мин. супернатант собирали и добавляли равный объем смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и тщательно перемешивали. Центрифугировали, как описано выше. Супернатант смешивали с равным объемом изопропанола и инкубировали при -20°C 2 ч. Осадки собирали центрифугированием при 12000 мин.⁻¹ 30 мин., промывали 0,3 мл 75%-ного этанола и центрифугировали при 5000 мин.⁻¹ 10 мин. Последнюю операцию повторяли дважды. Осадки высушивали на воздухе и растворяли в 50 µl TE буфера. Далее проводили вложенную (нестид) ПЦР: для первой амплификации использовали пару праймеров P1/16S-SR, за ней следовала вторая амплификация с праймерами R16F2n/R16R2n. Условия ПЦР: денатурация при 94°C — 1 мин., отжиг — 2 мин. при 55°C, амплификация — 3 мин. (7 мин. в заключительном цикле) при 72°C, количество циклов — 35.

Разбавленные ПЦР продукты (1:30) после первой амплификации были использованы в качестве матрицы во вложенной ПЦР. Нестид ПЦР-продукты (6µl) по отдельности обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AluI*, *HhaI*, *MseI* и *TaqI* в соответствии с инструкцией производителя. Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 5%-ном полиакриламидном геле и окрашивали бромистым этидием. Фрагменты ДНК выявляли ультрафиолетом. Для идентификации фитоплазм сравнивали полученные ПДРФ профили с опубликованными картами рестрикции [24].

Результаты

Образцы культурных и дикорастущих видов бобовых растений с симптомами поражения, характерными для фитоплазменной инфекции, были собраны в 5 областях РФ, представляющих 4 экономических региона: Северный (Архангельская и Вологодская области), Центральный (Московская область), Поволжский (Самарская область) и Западно-Сибирский (Новосибирская область). Результаты по определению и идентификации фитоплазм представлены в таблице 1.

Таблица 1

Инфицированность фитоплазмами образцов разных видов бобовых растений, собранных в 5 областях РФ

Вид растения	Группа (подгруппа) фитоплазмы	Количество инфицированных образцов	
<i>Архангельская область</i>			
<i>Trifolium hybridum</i> L.	Клевер гибридный	16SrIII-B	1
<i>Trifolium repens</i> L.	Клевер ползучий	16SrI-C	1
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Лядвенец рогатый	16SrIII-B	1
<i>Вологодская область</i>			
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Лядвенец рогатый	16SrI-C	1
<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	Люпин многолистный	16SrI-C	1

Продолжение табл. 1

Вид растения		Группа (подгруппа) фитоплазмы	Количество инфицированных образцов
<i>Medicago lupulina</i> L.	Люцерна хмелевидная	16SrIII-B	1
<i>Mellilotus album</i> Medik.	Донник белый	16SrI-C	1
		16SrIII	2
<i>T. hybridum</i> L.	Клевер гибридный	Смесь 16SrI-C и 16SrIII-B	1
		16SrIII-B	3
		Не идентифицированы	4
<i>T. medium</i> L.	Клевер средний	16SrIII-B	2
<i>T. pratense</i> L.	Клевер луговой	16SrI-A или B	2
<i>T. repens</i> L.	Клевер ползучий	16SrI-C	1
<i>Vicia faba</i> L.	Бобы конские	16SrIII-B	1
<i>Московская область</i>			
<i>Lathyrus sativa</i> L.	Чина луговая	16SrI-C	1
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Лядвенец рогатый	16SrI-C	2
		16SrIII-B	1
<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	Люпин многолистный	16SrIII	1
		16SrI-C	1
		16SrVI-A	1
<i>Mellilotus album</i> Medik.	Донник белый	16SrVI-A	1
		16SrI-C	1
<i>Mellilotus officinalis</i> L.	Донник желтый	16SrIII-B	2
<i>T. hybridum</i> L.	Клевер гибридный	16SrIII-B	6
		16SrI-C	11
		Смесь 16SrI-C и 16SrIII-B	2
		16SrIII-B, 16SrIII	6
<i>T. medium</i> L.	Клевер средний	16SrIII-B	1
<i>T. repens</i> L.	Клевер ползучий	16SrIII-B	4

Вид растения		Группа (подгруппа) фитоплазмы	Количество инфицированных образцов
<i>T. pratense</i> L.	Клевер луговой	16SrI-C,	2
		16SrI-C	2
		16SrIII-B, 16SrIII	11
<i>Trifolium</i>	Клевер (разные виды)	Не идентифицированы	5
<i>Vicia cracca</i> L.	Горошек мышиный	16SrI-C	1
<i>Vicia villosa</i> Roth.	Горошек мохнатый	16SrIII-B	1
<i>Vicia sepium</i> L.	Горошек заборный	16SrI-A	1
<i>Новосибирская область</i>			
<i>Cicer arietinum</i> L.	Нут	16SrVI-A	1
<i>Medicago sativa</i> L.	Люцерна посевная	16SrVI-A	2
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Фасоль обыкновенная	16SrVI-A	1
<i>Trifolium hybridum</i> L.	Клевер гибридный	16SrIII-B	2
<i>Trifolium medium</i> L.	Клевер средний	16SrXII-A	1
<i>Trifolium pannonicum</i> Jacq.	Клевер паннонский	16SrVI-A	2
		Не идентифицирован	1
<i>Vicia faba</i> L.	Бобы конские	16SrVI-A	1
<i>Самарская область</i>			
<i>Coronilla varia</i> L.	Вязель пестрый	16SrXII-A	1
		16SrI	1
<i>Laburnum anagyroides</i> Medik.	Бобовник анагировидный	16SrXII-A	1
		16SrIII	1
<i>Medicago lupulina</i> L.	Люцерна хмелевидная	16SrIII	1
<i>Medicago sativa</i> L.	Люцерна посевная	16SrXII-A	3
<i>Mellilotus album</i> Medik.	Донник белый	16SrXII-A	1
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Акация белая	16SrI-C	1
<i>Spartium junceum</i> L.	Дрок испанский	16SrXII-A	1
<i>Vicia cracca</i> L.	Горошек мышиный	16SrI-C	1

Из 23 образцов Северного региона, инфицированных фитоплазмой, 11 принадлежали к группе 16SrIII, подгруппе 16SrIII-B, или CYE (*Clover yellow edge* — краевое пожелтение клевера), 7 — к подгруппе 16SrI-C (CPh), один образец содержал смесь фитоплазм из этих двух групп, фитоплазмы 4-х образцов не удалось идентифицировать.

В Московской области было собрано и проанализировано 74 образца, 64 из них были инфицированы. Как и в Северном регионе, большая часть образцов из Московской области была заражена фитоплазмой группы 16SrIII (33 образца), несколько меньшая (21 образец) — фитоплазмой группы 16SrI подгруппы 16SrI-C. 2 образца были инфицированы смесью этих фитоплазм, еще 2 образца инфицированы фитоплазмой из группы 16SrVI подгруппы 16SrVI-A, или CP (*Clover proliferation* — пролиферации клевера). В 5 образцах фитоплазма была обнаружена, но не идентифицирована по причине малой концентрации патогена в растении.

Из Новосибирской области было получено и протестировано 30 образцов, но только 11 были инфицированы, причем большая часть — фитоплазмой подгруппы 16SrVI-A. 2 образца были инфицированы фитоплазмой из группы 16SrIII и 1 — фитоплазмой из группы 16SrXII подгруппы столбура — 16SrXII-A.

В образцах из Самарской области чаще всего встречалась фитоплазма из группы 16SrXII (подгруппа 16SrXII-A) и значительно реже — фитоплазма из групп 16SrI и 16SrIII.

Все инфицированные образцы были представлены 22 видами семейства бобовых. Больше всего образцов было собрано в Московской области, и здесь же был наиболее высокий процент инфицированных растений (84,4%), при этом 39% всех инфицированных образцов приходилось на долю клевера гибридного и 23% — на долю клевера лугового.

В таблице 2 представлены данные по количеству инфицированных и проанализированных на наличие фитоплазмы образцов в каждом из регионов в соответст-

Т а б л и ц а 2

Соотношения инфицированных и протестированных образцов бобовых растений, собранных в разных регионах РФ в 2009–2013 гг.

Область РФ	Количество инфицированных / протестированных образцов					
	2009	2010	2011	2012	2013	всего за 5 лет
Вологодская, Архангельская	13/15 (86,7%)	0	0	10/23 (43,5%)	0	23/38 (60,5%)
Московская	34/36 (94,4%)	5/6 (83,3%)	2/2 (100%)	23/30 (76,7%)	0	64/74 (84,4%)
Новосибирская	8/8 (100%)	1/12 (8,3%)	0	2/10 (20,0%)	0	11/30 (35,5%)
Самарская	0	0	0	8/8 (100%)	3/6 (50%)	11/14 (78,6%)
Всего по всем регионам	55/59 (93,2%)	6/18 (33,3%)	2/2	43/71 (60,6%)	3/6 (50%)	109/156 (69,9%)

вующем году и суммарно за все годы, а также указан процент инфицированных по отношению к проанализированным образцам. В некоторых случаях все растения, имевшие симптомы поражения, типичные для фитоплазменной болезни, оказывались инфицированными. В других образцах фитоплазма была выявлена лишь в малой части проанализированных растений.

В 2010 г. в Московской области цикадовые — возможные переносчики фитоплазм — были собраны с 4-х видов растений семейства бобовых: лядвенца рогатого, люцерны хмелевидной, клевера гибридного и клевера лугового. Отлов насекомых проводили в июле и в августе. В первой половине вегетации преобладающим видом, обитавшим на всех указанных выше бобовых травах, была цикадка *Sonronius binotatus*, второй по численности — пенница *Philaenus spumarius*. Во второй половине вегетационного периода преобладали цикадки *Lepyronia coleoptrata* и *Euscelis plebejus*. Цикадка *Sonronius binotatus*, доминировавшая в первой половине вегетации, не была обнаружена в августе. Замещающими видами стали цикадки *Balclutha punctata* и *Empoasca pteridis*. В конце июля и в августе численность популяции цикадовых значительно снизилась.

В таблице 3 представлены данные, отражающие видовой и численный состав цикадовых, собранных на каждом из 4-х видов трав, количество протестированных на наличие в них фитоплазмы и количество инфицированных особей. Количество цикадовых, собранных с клевера гибридного, было значительно больше, чем цикадовых с других трав. Меньше всего их было собрано с люцерны хмелевидной, так как ко времени второго сбора она пострадала от засухи. Из 137 протестированных

Таблица 3

Видовой состав цикадовых, обитавших на бобовых травах в окрестностях ВНИИФ (Московская область) в июле и августе 2010 г.

Вид насекомых подотряда цикадовых	Количество особей цикадовых (собранных / протестированных / инфицированных) с растений видов				Суммарное количество особей одного вида
	<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Medicago lupulina</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Trifolium hybridum</i>	
<i>Aphrodes bicinctus</i> Schr.	0	0	1 / 1 / 1	3 / 3 / 2	4 / 4 / 3
<i>Balclutha punctate</i> Fabricus	8 / 3 / 0	0	0	3 / 3 / 0	11 / 6 / 0
<i>Cicadula quadrinotata</i> F.	4 / 2 / 1	1 / 1 / 0	2 / 2 / 0	1 / 1 / 0	8 / 6 / 1
<i>Empoasca pteridis</i> Dhlb.	3 / 3 / 1	0	0	0	3 / 3 / 1
<i>Euconomelus lepidus</i> Boh.	1 / 1 / 0	0	2 / 2 / 0	3 / 3 / 0	6 / 6 / 0
<i>Euscelis plebejus</i> Fall.	2 / 2 / 2	1 / 1 / 1	18 / 18 / 7	11 / 11 / 8	32 / 32 / 18
<i>Lepyronia coleoptrata</i> L.	9 / 5 / 0	5 / 2 / 0	6 / 6 / 0	12 / 5 / 0	32 / 18 / 0
<i>Philaenus spumarius</i> L.	13 / 10 / 1	3 / 3 / 0	13 / 5 / 0	14 / 8 / 0	43 / 26 / 1
<i>Sonronius binotatus</i> Sahlb.	44 / 5 / 0	17 / 3 / 0	49 / 6 / 0	98 / 28 / 1	208 / 42 / 1
Суммарное количество особей:	84/31/5	27/10/1	91/40/8	145/62/11	347 / 143 / 25

особей 25 оказались носителями фитоплазмы, причем у 22 выявленная фитоплазма принадлежала к группе 16SrIII, две цикадки *Aphrodes bicinctus* содержали смесь фитоплазм, которые не были идентифицированы, а одна, *Sonronius binotatus*, была инфицирована фитоплазмой из группы 16SrI.

Видовое разнообразие цикадовых на всех видах бобовых трав было примерно сходным. 5 видов цикадовых семейства Cicadellidae и 1 — семейства Aphrophoridae (*Philaenus spumarius*) — были носителями фитоплазм (табл. 4). Наиболее высокая инфицированность (50% особей) наблюдалась среди цикадок *Euscelis plebejus*. У остальных представителей этого подотряда лишь единичные особи были носителями фитоплазмы.

Таблица 4

Количество, видовое разнообразие, кормовые предпочтения и носители фитоплазм среди цикадовых, обитавших на бобовых в окрестностях ВНИИФ (Московская область) в 2010 г.

Цикадовые насекомые	<i>Trifolium hybridum</i>	<i>Trifolium pratense</i>	<i>Medicago lupulina</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
Количество особей в пересчете на 100 взмахов сачка	125	103	93	225
Количество видов	7	7	5	7
Количество видов — носителей фитоплазмы	3	2	1	4
Потенциальные векторы фитоплазм:	<i>Aphrodes bicinctus</i> , <i>Cicadula quadrinotata</i> , <i>Empoasca pteridis</i> , <i>Euscelis plebejus</i> , <i>Philaenus spumarius</i> , <i>Sonronius binotatus</i>			

В 2011 г. уровень инфицирования фитоплазмами был низким. Только в 2-х образцах бобовых — чине луговой и клевере луговом из Московской области — была обнаружена фитоплазма из подгруппы 16SrI-C. Насекомых в тот год собирали только с участков опытных посадок картофеля и обочин.

В 2012 г. насекомые были собраны с лугового и гибридного клевера. Из 78 протестированных насекомых только в одной особи *Aphrodes bicinctus* была обнаружена фитоплазма из группы 16SrXII подгруппы столбура (табл. 5).

Обсуждение результатов

Большинство возделываемых видов бобовых являются многолетними культурами, что обуславливает возможность накопления комплекса вредных организмов включая фитоплазмы. По сообщению Богоутдинова и Зудилина [3], в России признаки фитоплазменного поражения выявлены на 35 видах растений семейства бобовых, 94% которых составляют многолетние виды, в том числе 23% — деревья и кустарники.

К наиболее значимым болезням бобовых культур в РФ относятся фитоплазмозы клевера и люцерны.

Фитоплазмозы клевера. Характерными признаками этих заболеваний является изменение окраски листьев, а также изменение генеративных органов: позелене-

Видовой состав и инфицированность фитоплазмами цикадовых, обитающих на бобовых травах в окрестностях ВНИИФ (Московская область) в июне-августе 2012 г.

Вид цикадовых насекомых	Количество собранных / протестированных / инфицированных особей цикадовых насекомых с растений вида:		
	<i>T. pratense</i>	<i>T. hybridum</i>	всего
<i>Aphrodes bicinctus</i> Schr.	17 / 17 / 0	23 / 23 / 1	40 / 40 / 1
<i>Balclutha punctata</i> Fabricus	3 / 3 / 0	0	3 / 3 / 0
<i>Empoasca pteridis</i> Dhlb.	3 / 3 / 0	14 / 14 / 0	17 / 17 / 0
<i>Eupteryx atropunctata</i> Goeze	0	2 / 2 / 0	2 / 2 / 0
<i>Lepyronia coleoptrata</i> L.	9 / 9 / 0	3 / 3 / 0	12 / 12 / 0
<i>Macrosteles laevis</i> Rib.	0	3 / 3 / 0	3 / 3 / 0
<i>Sonronius binotatus</i> Sahlb..	1 / 1 / 0	0	1 / 1 / 0
Общее количество особей	33 / 33 / 0	45 / 45 / 1	78 / 78 / 1
Количество видов	5	5	7

ние лепестков, превращение их в листья и израстание элементов соцветия с образованием побегов (рис. 1), что приводит к снижению семенной продуктивности и зеленой массы. Симптомы болезни могут варьировать в широких пределах в зависимости от таксономической принадлежности фитоплазмы, вида клевера, экологических условий, фазы заражения и др. В классификации фитоплазменных болезней одна группа и две подгруппы фитоплазм получили названия по заболеваниям, обнаруженным на клевере: 1) группа 16SrVI — «Пролиферация клевера» (*Clover proliferation* — CP), 2) подгруппа 16SrIII-B — «Краевое пожелтение клевера» (*Clover yellow edge* — CYE) — из группы 16SrIII — «X-болезнь» (*X-disease*) и 3) подгруппа 16SrI-C — «Филлодия клевера» (*Clover phyllody*— CPh) из группы 16SrI «Желтухи астр» (*Aster yellows*). Однако фитоплазмы клевера могут вызываться и другими фитоплазмами, например, фитоплазмой желтухи вяза (16SrV) и столбура (16SrXII) [33].

В 2009, 2010 и 2012 гг. мы провели мониторинг заболеваний клевера в Вологодской, Московской и Новосибирской областях. Из 68 инфицированных фитоплазмами растений 35 (51,4%) были инфицированы фитоплазмой из 16SrI группы, вызвавшей болезнь «Филлодия клевера» — CPh, а 18 (26,5%) — фитоплазмой из группы 16SrIII подгруппы CYE — «Краевое пожелтение клевера». В образцах из Западной Сибири преобладала болезнь, вызванная фитоплазмой из подгруппы 16SrVI-A — «Пролиферация клевера», которая была обнаружена в нуте, люцерне, фасоли, конских бобах и клевере паннонском. Ранее сходная фитопlasма из клевера гибридного была идентифицирована как '*Candidatus Phytoplasma trifolii*' [20]. Сообщалось, что '*Ca. P. trifolii*' и похожие штаммы встречаются в Канаде, США и Индии [19]. Симптомы болезни клевера, вызываемые наиболее часто встречающимися фитоплазмами подгрупп 16SrI-C (CPh) и 16SrIII-B (CYE), могут соответствовать названиям болез-

ни — «Филлодия клевера» и «Краевое пожелтение клевера» соответственно, а могут и не соответствовать. Так, пожелтение в случае инфицирования фитоплазмой 16SrIII-B действительно иногда наблюдается, однако чаще происходит покраснение краев листьев, а у клевера лугового края листьев становятся коричневато-бордовыми (рис. 1, 2, 3). Инфицирование этой фитоплазмой может приводить и к появлению филлодий (рис. 4). Фитоплазма из подгруппы 16SrI-C может не только вызывать изменение генеративных органов растения, например, виресценцию, как это следует из рисунка 5, но и влиять на окраску листьев (рис. 6).

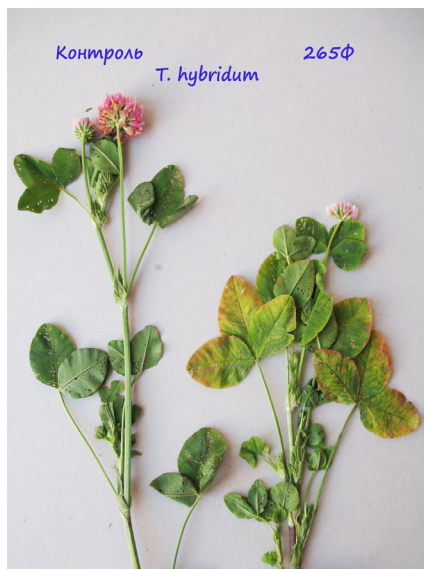


Рис. 1. Справа — клевер гибридный, инфицированный фитоплазмой подгруппы 16SrIII-B — краевого пожелтения клевера (CYE). Слева — здоровый экземпляр

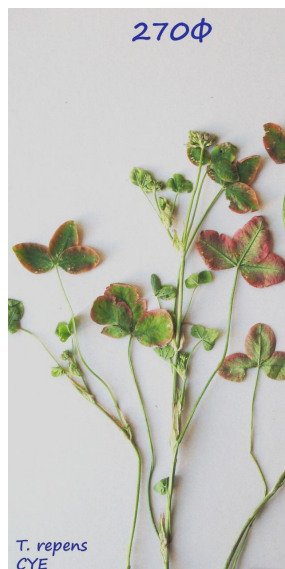


Рис. 2. Клевер ползучий, инфицированный фитоплазмой подгруппы 16SrIII-B

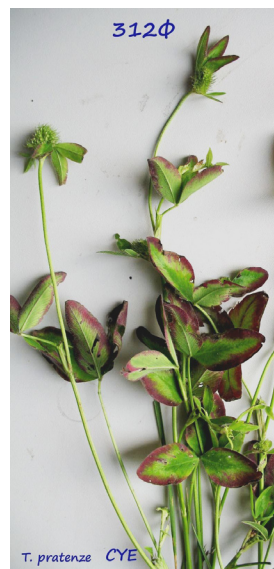


Рис. 3. Клевер луговой инфицирован фитоплазмой из подгруппы 16SrIII-B

По нашим наблюдениям, видоизменения соцветий наблюдаются при условии хорошей влагообеспеченности растений, поэтому указанный тип заболевания обычен для Нечерноземья. Для фитоплазмозов бобовых часто характерны карликовость, повышенная кустистость, измельчение листьев, соцветий и обесцвечивание последних.

В 2010 г. в Московской области на куртинах с бобовыми, включавшими в себя два вида клевера (луговой и гибридный), люцерну хмелевидную и лядвенец рогатый, из 143 тестированных особей цикадовых в 25 обнаружено наличие фитоплазмы. 24 особи из семейств Aphrophoridae и Cicadellidae были инфицированы фитоплазмами из группы 16SrIII. Подавляющее большинство инфицированных цикадок (18) принадлежало к виду *Euscelis plebejus*, другие 6 носителей фитоплазмы группы 16SrIII принадлежали к трем разным видам: 3 особи — *Aphrodes bicinctus*, одна особь — *Cicadula quadrinotata* и еще одна — *Empoasca pteridis*. Одна цикадка *Sonronius binotatus* была инфицирована фитоплазмой подгруппы 16SrI-C.



Рис. 4. Клевер ползучий, инфицированный фитоплазмой из подгруппы 16SrIII-B — CYE



Рис. 5. Клевер гибридный, инфицированный фитоплазмой из подгруппы 16SrI-C — филлодии клевера, CPh



Рис. 6. Клевер гибридный, инфицированный фитоплазмой из подгруппы 16SrI-C — филлодии клевера, CPh

Что касается бобовых растений, с которых были собраны насекомые, то обнаруженные у них фитоплазмы были разнообразнее, но большая часть принадлежала к тем же двум группам. Цикадки *Aphrodes bicinctus* Schrank, *Macrosteles laevis* Ribaut., *Euscelis plebejus* Fall. и пенница *Phyllaenus spumarius* L. ранее были известны в РФ и Литве в качестве переносчиков заболеваний, вызываемых фитоплазмами [6, 15]. В 2012 г. видовое разнообразие цикадовых, обитавших на клеверах, было примерно таким же, как в 2010 г., однако на 78 особей, протестированных на наличие фитоплазмы, приходилась только одна инфицированная цикадка (*Aphrodes bicinctus*), у которой была выявлена фитоплазма столбура — 16SrXII-A.

Фитоплазмы люцерны. К наиболее распространенным фитоплазменным заболеваниям люцерны относится «ведьмина метла». Заболевание приводит к образованию многочисленных, часто карликовых побегов с редуцированными листьями и репродуктивными органами. Вес вегетативных органов и семян снижается более чем на 50%, а при сильном развитии заболевания соцветия и семена не образуются. Листья могут приобретать гофрированность, желтеть или краснеть. Филлодия, характерная для клеверов, на люцерне, в частности, в Самарской области, наблюдается редко. Вредоносность заболеваний возрастает из-за большей восприимчивости инфицированных фитоплазмой растений к грибным и бактериальным патогенам, которые могут вызывать гибель растений в период перезимовки и приводить к изреженности посевов [3, 11]. В Среднем и Нижнем Поволжье «ведьмина метла» — обычное заболевание; в зависимости от возраста травостоя им поражаются от 5 до 100% растений. К сожалению, в течение 2009–2013 гг. мы получили из регионов и могли

проанализировать лишь единичные растения люцерны посевной с симптомами фитоплазменных заболеваний. В 2012 г. были получены 2 образца, оба собранные в мае, один — с симптомами карликовости и мозаичности листьев из Самарской области, второй — также с симптомом карликовости, из Рязанской области; в первом была обнаружена фитоплазма из группы 16SrIII, во втором — фитоплазма из группы столбура (16SrXII-A). В том же году, осенью, были получены 3 образца люцерны посевной с типичными симптомами «ведьминой метлы» из Самарской области (рис. 7). Во всех трех образцах была идентифицирована фитоплазма столбура — 16SrXII-A. Два образца люцерны посевной из Новосибирской области, собранные в 2010 г., были инфицированы фитоплазмой из подгруппы пролиферации клевера 16SrVI-A. Сорное растение люцерны хмелевидная из Вологодской области в 2009 г. была резерватом фитоплазмы из группы 16SrIII (рис. 8, 9).



Рис. 7. Фрагменты люцерны посевной с симптомами карликовости и «ведьминой метлы».



Рис. 8. Люцерна хмелевидная, контроль



Рис. 9. Люцерна хмелевидная с симптомами «ведьминой метлы», инфицирована фитоплазмой из группы 16SrIII, X-болезнь (CX)

В РФ ареал заболевания люцерны включает в себя Волгоградскую, Новосибирскую, Оренбургскую, Пензенскую, Ростовскую, Самарскую, Саратовскую, Ульяновскую области, Алтайский край, Северный Кавказ и юг Татарстана [1, 2, 4, 5, 10, 13]. Заболевание встречается также в Казахстане [8, 11, 12, 15], Киргизии [14], Узбекистане [9] и Украине [2].

За рубежом фитоплазмы люцерны известны в Австралии [28], Аргентине [18], Боливии [21], Индии [29], Италии [26], Литве [31], Омане [22], Саудовской Аравии [17] и Северной Америке [27].

В бывшем СССР основным переносчиком заболевания была признана люцерновая листоблошка *Cyamophila medicaginis* And. [11, 12]. В Самарской области экспериментально была подтверждена передача заболевания цикадками видов *Aphrodes bicinctus* Schrank, *Euscelis plebejus* Fall. и пенницей *Phyllaenus spumarius* L. [3]. В настоящей работе эти же виды были показаны как носители фитоплазм в Московской области, а кроме них — цикадки *Cicadula quadrinotata*, *Empoasca pteridis* и *Sonronius binotatus*. Еще 3 вида цикадок, *Balclutha punctata* Fabricus, *Macrosteles laevis* Rib., *Eupteryx atropunctata* Goeze, свинушка *Euconomelus lepidus* Boh. и пенница *Lepyronia coleoptrata* L., были неизменными обитателями бобовых трав, из них *Balclutha punctata*, *Eupteryx atropunctata* и *Macrosteles laevis* Rib., собранные в те же годы на картофеле, показали наличие фитоплазменной инфекции.

Кроме названных видов, поля многолетних бобовых трав заселяют также цикадки родов *Pentastiridius* и *Psammotetix*, носатки рода *Dictyophara* (сем. Dictyopharidae), горбатки рода *Stictocephala* (сем. Membracidae) и др., среди которых есть виды, известные как переносчики фитоплазм [2].

В 2012–2013 гг. также были выявлены фитоплазмы в древесных и кустарниковых видах бобовых растений (табл. 1). В декоративном кустарнике бобовнике анагировидном обнаружены фитоплазмы группы 16SrIII и подгруппы 16SrXII-A, в дроче испанском — фитоплазма 16SrXII-A, псевдоакация белой — 16SrI-C. Обнаружение фитоплазм в древесных и кустарниковых растениях требует кардинального изменения стратегии защитных мероприятий [7].

Заключение

С 2009 по 2013 гг. фитоплазмы, принадлежащие к 4 группам и 5 подгруппам (подгруппы 16SrI-A и C, 16SrIII-B, 16SrVI-A и 16SrXII-A), были идентифицированы в растениях семейства бобовых в 5 областях, входящих в 4 экономических региона РФ: Северный, Центральный, Поволжский и Западно-Сибирский. В Московской области исследован видовой состав насекомых подотряда цикадовых, обитающих на бобовых травах, среди которых выявлено 6 видов возможных переносчиков фитоплазменной инфекции. Основным носителем фитоплазмы была цикадка *Euscelis plebejus*.

Культурные и дикорастущие многолетние бобовые растения являются излюбленными станциями обитания цикадовых — переносчиков фитоплазм, резерваторами и накопителями фитоплазменной инфекции, что следует учитывать при размещении сельскохозяйственных культур в севооборотах, поскольку многолетние бобовые могут быть источником инфекции — например, для пасленовых. Важно своевременно выявлять наличие патогена в растениях-резерваторах и насекомых-векторах, для чего необходимо использовать современные методы молекулярной биологии. Для предотвращения инфицирования сельскохозяйственных культур фитоплазмами следует применять комплекс мероприятий по ограничению численности растений-резерваторов и цикадовых — переносчиков — или обеспечивать изоляцию посевов и посадок.

Библиографический список

1. Бгаишев В.Л., Карабахян Р.А., Ледовская Н.И. Основные микоплазменные заболевания пасленовых и бобовых культур в южных районах СССР // Микоплазменные болезни растений: Труды ВИЗР. Л., 1979. С. 77–80.

2. Богоутдинов Д.З. Ведьмина метла люцерны (фитоплазмоз): этиология болезни, состояние изученности // Вестник защиты растений. 2013. № 3. С. 26–33. <http://vestnik.iczr.ru/rus/liter/referats/r2013-3-3.html>.
3. Богоутдинов Д.З., Зудилин С.Н. Ведьмина метла и мозаика на люцерне посевной и козлятнике восточном // Агро XXI. 2000. № 12. С. 14–16. <http://issuu.com/agroxxi/docs/journal200012?e=6508124/3405548>.
4. Власов Ю.И., Васькин Д.В., Еремин В.Г., Дьячук А.Л. «Ведьмина метла» — карликовость люцерны (основные сведения о заболевании, методах изучения, мерах борьбы с ним). Саратов, 1990. 90 с.
5. Власов Ю.И., Самсонова Л.Н., Лебедев В.Б., Васькин Д.В. Рекомендации по защите люцерны от микоплазменной болезни — карликовости в Нижнем Поволжье. Саратов, 1987. 24 с.
6. Гените Л.П., Радзевичюс Б.Б. Микоплазмозы клевера // Защита растений. 1982. № 9. С. 44–45.
7. Гирсова Н.В. Богоутдинов Д.З., Можсаева К.А., Кастальева Т.Б. Фитоплазмозы деревьев и кустарников в Поволжье // Известия ТСХА. 2014. Выпуск 5. С. 37–49.
8. Гольдин М.И., Елисеева З.Н. Вирусные заболевания люцерны в Алма-Атинской области // Труды института микробиологии и вирусологии АН Казахской ССР. Алма-Ата, 1969. № 12. С. 114–116.
9. Горбунова Н.И., Шевцова Л.Б., Шевякова М.И., Давыдкина Л.Н., Брызгалова И.Ф., Бактикова Р.Ф. Микоплазмы люцерны в Средней Азии / Вирусные болезни сельскохозяйственных культур. М., 1980. С. 76–83.
10. Давыдов П.Н. Болезнь люцерны «Ведьмины метлы» // Селекция и семеноводство. 1949. № 9. С. 72.
11. Елисеева З.Н., Тулегенов Т.А., Ахатова Ф.Х. Вирусные болезни бобовых культур на юго-востоке Казахстана. Алма-Ата, 1978. 126 с.
12. Казанский А.Р., Качалова Н.Р. Опасное вирусное заболевание люцерны в Казахстане // Советская агрономия. 1952. № 6. С. 60–67.
13. Леонтьева Ю.А., Леонтьева Г.В., Макеева А.М. Распространение и вредоносность метельчатости люцерны в Куйбышевской области // Селекция и защита растений. Куйбышев, 1978. С. 18–21.
14. Малютина Р.М. Вирусные и микоплазменные болезни растений в Киргизии // Вопросы агрономии. Фрунзе, 1978. С. 119–123.
15. Г.М. Вирусная болезнь — позеленение цветков клевера — и ее распространение в природе // Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и меры борьбы с ними. М., 1960. С. 273–276.
16. Хорошева Т.М. Ведьмина метла люцерны в Поволжье // Агро XXI. 2002. № 5. С. 6. <http://issuu.com/agroxxi/docs/journal200205?e=6508124/4438330>.
17. Alhudaib K. Detection and characterization of phytoplasma pathogen in alfalfa and in its potential vector in Saudi Arabia // Indian Journal of Plant Protection. 2009. V. 37. P. 97–100.
18. Conci L., Meneguzzi N., Galdeano E., Torres L., Nome C. and Nome S. Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group ('Candidatus Phytoplasma fraxini') // European Journal of Plant Pathology. 2005. V. 113. P. 255–265. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-005-0298-9>.
19. Firrao G., Gibb K., Streten C. Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma' // Journal of Plant Pathology. 2005. V. 87 (4, special issue). P. 249–263. <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/download/926/712>.
20. Hiruki C., Wang, K.R. Clover Proliferation Phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii' // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2004. V. 54. P. 1349–1353. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02842-0>.
21. Jones P., Arocha Y., Plata G. First report of a 'Candidatus phytoplasma asteris' isolate associated with a witches' broom disease of alfalfa in Bolivia // Disease Reports. 2005. V. 11. P. 14. <http://ndrs.org.uk/article.php?id=011014>.

22. Khan A.J., Botti S., Al-Subhi A.M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A.F. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches' broom in Oman // *Phytopathology*. 2002. V. 92. P. 1038–1047. <http://www.iwbdln.ir/iwbdln-papers/asp1.pdf>.
23. Lee I.-M., Davis R.E. and Gundersen-Rindal D.E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes // *Annual Review of Microbiology*. 2000. V. 54. P. 221–555. http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.54.1.221?url_ver=Z39.88-2003&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=micro.
24. Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences // *International journal of systematic bacteriology*. 1998. V. 48. P. 1153–1169. <http://ijs.sgmjournals.org/content/48/4/1153>.
25. Lee I.-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms // *Phytopathology*. 1993. V. 83. P. 834–842.
26. Marcone C, Ragozzino A, Seemüller E. Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in Southern Italy // *Journal of Plant Pathology*. 1997. V. 79. P. 211–217.
27. Menzies J.D. Witches' broom of alfalfa in North America // *Phytopathology*. 1946. V. 36 (9). P. 762–774.
28. Pilkington L.J., Gibb K.S., Gurr G.M., Fletcher M.J., Nikandrow A., Elliott E., van de Ven, Read D.M.Y. Detection and identification of a phytoplasma from lucerne with Australian lucerne yellows disease // *Plant Pathology*. 2003. V. 52. P. 754–762. [http://wiki.pestinfo.org/wiki/Plant_Pathology_\(2003\)_52_754-762](http://wiki.pestinfo.org/wiki/Plant_Pathology_(2003)_52_754-762).
29. Sarganayana V., Singh S., Muniyappa V., Redy H. Little leaf of Medicago — a new phytoplasma disease in India // *Journal of tropical plant diseases*. 1996. V. 14. P. 167–171.
30. Tanne E., Boudon-Padiou E., Clair D., Davidovich M., Melamed S., Klein M. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability // *Phytopathology*. 2001. V. 91. P. 741–746. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2001.91.8.741>.
31. Valiunas D., Jomantiene R., Davis R.E., Sindaroviene I., Alminaitė A., Staniulis J. Molecular detection and characterization phytoplasmas infecting vegetables, legumes ornamental plants in Lithuania. // *Transaction of the Estonian agricultural university, (Agronomy)*. 2009. P. 220–223.
32. Wei W., Davis R.E., Lee I.-M., Zhao Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007. V. 57. P. 1855–1867. <http://ijs.sgmjournals.org/content/57/8/1855.abstract?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&author1=wei&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&resourcetype=HWCIT>.
33. Weintraub P.G., Beanland L. Insect vectors of phytoplasmas // *Annual review of entomology*. 2006. V. 51. P. 91–111. PMID:16332205 doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151039. CrossRef, PubMed.
34. Zhao Y., Wei W., Lee I.-M., Shao J., Suo X. and Davis R.E. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, IPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009. V. 59. P. 2582–2593. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622670?dopt=Abstract>.

PHYTOPLASMA DISEASES OF LEGUMES

N.V. GIRSOVA¹, T.B. KASTALYEVA¹, YU.I. MESHKOV¹,
K.A. MOZHAJEVA¹, D.Z. BOGOUTDINOV²

(¹ Russian Research Institute of Phytopathology;
² Samara State Agricultural Academy)

*One hundred and ten samples presenting 22 cultural and wild species from Fabaceae family collected in four Economic Regions of Russia from 2009 to 2013 were infected with phytoplasmas belonging to four groups and five subgroups. The majority of samples from the Northern and Central Regions were infected with subgroup 16SrI-C and 16SrIII-B phytoplasmas, while subgroup 16SrVI-A and 16SrXII-A phytoplasma prevailed among the samples from West Siberian and Volga Regions, respectively. Nine species (in 2010) and seven species (in 2012) of insects belonging to order Hemiptera, suborder Auchenorrhyncha were found on legumes located nearby the Russian Research Institute of Phytopathology in Moscow district. Moreover, six of them are known to be carriers of phytoplasmas, i.e. potential phytoplasma-vectors, they are: leafhoppers *Aphrodes bicinctus*, *Cicadula quadrinotata*, *Empoasca pteridis*, *Euscelis plebejus*, *Sonronius binotatus* and froghopper *Philaenus spumarius*.*

Key words: clover proliferation legumes, phytoplasma disease, clover phyllody, clover yellow edge, Alfalfa dwarfishness, phytoplasma taxonomic classification, cicadas phytoplasma-vectors.

Гирсова Наталья Викторовна — к. б. н., ст. науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (143050, Московская обл., Одинцовский район, п/о Большие Вяземы; тел.: (498) 694-10-00; e-mail: ngirsova@yandex.ru).

Кастальева Татьяна Борисовна — к. б. н., вед. науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (143050, Московская обл., Одинцовский район, п/о Большие Вяземы; тел.: (498) 694-10-00, (916) 735-18-36; факс: (498) 694-11-24; e-mail: kastalyeva@vniif.ru, kastalyeva@yandex.ru).

Мешков Юрий Иванович — к. б. н., ст. науч. сотр. Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (143050, Московская обл., Одинцовский район, п/о Большие Вяземы; тел.: (903) 545-90-56; e-mail: yimeshkov@rambler.ru).

Можаява Карина Алексеевна — к. с.-х. н., зав. лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (143050, Московская обл., Одинцовский район, п/о Большие Вяземы; тел.: (498) 694-10-00, (915) 153-38-09; e-mail: mozhajeva@vniif.ru).

Богоутдинов Дамир Забихуллович — к. б. н., доц. кафедры химии и защиты растений Самарской государственной сельскохозяйственной академии (446442, Самарская обл., Кинель, пос. Усть-Кинельский, ул. Учебная, 2; тел.: (84663) 4-61-31; e-mail: bogoutdinov@list.ru).

Girsova Nataliya Viktorovna — PhD in Biology, senior researcher, Russian Research Institute of Phytopathology (143050, Moscow district, Odintsovo region, Bolshiye Vyazemy; tel.: +7 (498) 694-10-00; e-mail: ngirsova@yandex.ru).

Kastalyeva Tatyana Borisovna — PhD in Biology, leading researcher, Russian Research Institute of Phytopathology (143050, Moscow district, Odintsovo region, Bolshiye Vyazemy; tel.: +7 (498) 694-10-00, +7 (916) 735-18-36; fax: +7 (498) 694-11-24; e-mail: kastalyeva@vniif.ru).

Meshkov Yuriy Ivanovich — PhD in Biology, senior researcher, Russian Research Institute of Phytopathology (143050, Moscow district, Odintsovo region, Bolshiye Vyazemy; tel.: +7 (903) 545-90-56; e-mail: yimeshkov@rambler.ru).

Mozhaeva Karina Alekseevna — PhD in Agriculture, Head of the laboratory of Russian Research Institute of Phytopathology (143050, Moscow district, Odintsovo region, Bolshiye Vyazemy; tel.: +7 (915) 153-38-09, +7 (498) 694-10-00; e-mail: mozhajeva@vniif.ru).

Bogoutdinov Damir Zabikhullovich — PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Chemistry and Plant Protection, Samara State Agricultural Academy (446442, Samara region, Ust-Kinelskiy, Utchebnaya street, 2; tel.: (84663) 4-61-31; e-mail: bogoutdinov@list.ru).