

УДК 632.92*579.8

ОБНАРУЖЕНИЕ ФИТОПЛАЗМЫ ГРУППЫ 16SrXXI В СОСНЕ ОБЫКНОВЕННОЙ И СОСНЕ ГОРНОЙ¹

© 2024 г. Н. В. Гирсова^а, Д. З. Богоутдинов^а, А. Г. Молчанов^б, Т. Б. Кастальева^{а, *}

^аВсероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, ул. Институт, влд. 5, р.п. Большие Вяземы, Одинцовский р-он, Московская область, 143050 Россия

^бИнститут лесоведения РАН, ул. Советская, д. 21, с. Успенское, г. Одинцово, 143030 Россия

*E-mail: kastalyeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.09.2022 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 10.10.2023 г.

Одна из причин ухудшения состояния древостоя хвойных в ряде стран Европы связана с инфицированностью их фитоплазмами — облигатными внутриклеточными патогенами — бактериями, лишенными клеточной стенки. Цель работы — выявить наличие фитоплазменной инфекции в образцах хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и сосны горной (*Pinus mugo* Turra), собранных в Московской и Самарской областях и имевших характерные симптомы заболевания, а также определить таксономическую принадлежность фитоплазмы. Для обнаружения фитоплазмы использовали прямую и вложенную ПЦР с парами праймеров P1/16S-Sr и R16F2n/R16R2 соответственно. ДНК фитоплазмы была обнаружена в шести из семи экземпляров сосны, включая бессимптомную. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов после обработки ампликонов ДНК эндонуклеазами рестрикции AluI, MseI, NhaI, HpaII, HaeIII, RsaI и TaqI свидетельствовал о сходстве российских штаммов фитоплазмы сосны обыкновенной и сосны горной с литовскими штаммами PineLRN и PineBLD фитоплазмы сосны горной (GenBank Accession Number MK089821 и MK089819 соответственно), идентифицированной как '*Candidatus Phytoplasma pini*' (подгруппа 16SrXXI-A). Фитоплазма, родственная этому виду, зарегистрирована на территории Российской Федерации впервые.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, сосна горная, фитоплазмы, '*Candidatus Phytoplasma pini*'.

DOI: 10.31857/S0024114824020096 EDN: REVCBA

Фитоплазмы — это бактерии, лишенные клеточной стенки, облигатные внутриклеточные паразиты, обитающие в ситовидных трубках покрытосеменных и ситовидных клетках флоэмы папоротникообразных и голосеменных растений и передающиеся от растения к растению насекомыми из отряда Hemiptera. Из-за неспособности этих патогенов расти на искусственных питательных средах наиболее надежное доказательство фитоплазменной этиологии заболевания растения может быть получено с использованием молекулярных методов исследования: анализа первичной структуры ДНК консервативного гена 16S рРНК посредством разрезания ДНК, амплифицированной с помощью ПЦР, набором эндонуклеаз рестрикции (метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов — ПДРФ), либо непосредственно определяя ее нуклеотидную последовательность

путем секвенирования. На этом же основана и таксономия фитоплазм. Фитоплазмы инфицируют более 1000 видов растений по всему миру, что может привести к серьезному экономическому ущербу (Marcose, 2014).

Фитоплазмы вызывают широкий спектр уникальных симптомов, включая филлодию, пожелтение, карликовость, ведьмины метлы, покраснение верхних листьев (пурпурность вершины), некроз флоэмы (Namba, 2019). Для болезней хвойных, вызванных фитоплазменной инфекцией, характерными симптомами являются аномально мелкая желтая или красноватая хвоя, усыхание отдельных ветвей или всего дерева, а также развитие ведьминых метел — шаровидных или бесформенных структур, образовавшихся в результате пролиферации коротких ветвей (Trujillo-Toro, Navarro-Cerrillo, 2019; Valiunas et al., 2019).

Помимо закупорки элементов флоэмы и их некроза, вызывающих невозможность перераспределения продуктов фотосинтеза и эндогормонов, фитоплазмы также способны формировать

¹ Исследование выполнено в рамках темы государственного задания РАН 0598-2019-0002.

комплекс эффекторных белков. Эффектор — это белок, секретлируемый микробным патогеном или насекомым в клетку хозяина для усиления его способности к размножению. Эффекторами называют также элиситоры, токсины, аналоги фитогормонов, ферменты деградации клеточной стенки и другие молекулы, которые изменяют растение-хозяина (Hogenhout et al., 2009).

Фитоплазменные эффекторы (SAP11, SAP54, SAP09, TENGU и др.) могут вызывать снижение экспрессии генов синтеза регуляторов роста и защитных веществ, что проявляется в пороках развития вегетативных органов, таких как карликовость, повышенная кустистость, деформация отдельных органов. Они также снижают иммунитет растений, что приводит к более интенсивному заражению другими патогенами и вредителями. В частности, пептид TENGU, подавляющий факторы синтеза жасмоновой и салициловой кислот и, как следствие, снижающий защитные реакции растений, усиливает рост бактериальных патогенов и плодовитость насекомых-переносчиков (Uzma Rashid et al., 2018; Oshima et al., 2023). В 2020 г. появилось сообщение об открытии нового семейства эффекторов фитоплазмы, названных филлогенами, которые могут вызывать пороки развития репродуктивных органов, в том числе филлодию цветков (Iwabuchi et al., 2020).

Наличие фитоплазмы у представителя голосеменных растений — кипариса (*Cupressus*) с симптомами ведьминой метлы, низкорослости и фациацией впервые показано в 1998 году в Италии с использованием метода вложенной ПЦР с праймерами, специфичными к фитоплазме группы 16SrIII (Paltrinieri et al., 1998). Впервые фитоплазма вида '*Candidatus Phytoplasma pini*', отнесенная к отдельной новой группе 16SrXXI, идентифицирована в 2005 г. в сосне обыкновенной из Германии (AJ632155)² и в сосне алеппской (*Pinus halepensis* Miller) из Испании (Барселона) (Schneider et al., 2005). В последующем, в 2007–2016 гг., фитоплазмы выявлены в единичных экземплярах десяти видов хвойных растений из Польши, Чехии, Китая, Хорватии, Литвы и США (Śliwa et al., 2008; Kaminska et al., 2011; Kaminska, Berniak, 2011; Huang et al., 2011; Ježić et al., 2013; Valiunas et al., 2015; Costanzo et al., 2016). Все они принадлежали к группе 16SrXXI, подгруппе 16SrXXI-A. В США в сосне колючей (*Pinus pungens* Lamb) с симптомами ведьминой метлы была выявлена фитоплазма (штамм MDPP) той же группы, имевшая, однако, отличия в последовательности гена 16S рРНК, что позволило отнести ее к новой подгруппе 16SrXXI-B. Позднее опубликована предварительная версия последовательности генома

этого штамма, состоящая из 474136 оснований (Cai et al., 2020). В Литве при анализе 300 растений сосны с характерными симптомами фитоплазма выявлена в 80% сосны обыкновенной и горной. Главные признаки инфицирования — укорочение игл, имеющих желтый или красноватый цвет, отсутствие игл на ветвях, усыхание ветвей и гибель деревьев. Иногда встречались шаровидные ведьмины метлы (Valiunas et al., 2015).

Широкое распространение фитоплазменных болезней в Европе и большой урон, наносимый ими лесам, свидетельствуют о серьезной угрозе для лесной промышленности и экологии (Valiunas et al., 2015, 2019). Учитывая это, исследователи из Литвы и США разработали новые протоколы и пары праймеров для обнаружения '*Candidatus Phytoplasma pini*' путем амплификации фрагмента 16S рДНК размером 484 п.н. и фрагмента гена *tuf* размером 513 п.н., которые содержат участки, уникальные для этой фитоплазмы, что позволяет, не прибегая к вложенной, а используя лишь прямую ПЦР, быстро идентифицировать '*Candidatus Phytoplasma pini*' (Valiunas et al., 2019).

До недавнего времени не было никаких сведений о возможных переносчиках фитоплазм хвойных. В Литве исследовали различные виды насекомых, населяющих сосну, фитоплазму выявили в трех видах тли рода *Cinara*: *C. pini* L., *C. piniphila* Ratzeburg и *Cinara pineti* Fabricius. Предполагается, что они могут быть переносчиками фитоплазмы (Ivanauskas et al., 2021).

Обнаружение фитоплазмы у хвойных видов деревьев позволило по-новому рассмотреть причины массового усыхания природных массивов в Средиземноморском и Балтийском регионах Европы, причиной которых ранее считалось потепление климата. В качестве потенциально опасного вредителя разных видов сосны, включая сосну алеппскую, стали рассматривать патоген '*Candidatus Phytoplasma pini*'. На основании наблюдаемых типичных симптомов на сосне алеппской — пролиферации пазушных почек, образования ведьминых метел, аномального удлинения междоузлий, отставания в росте, относительно быстрой дефолиации — исследователи пришли к выводу, что инфицирование фитоплазмой сосны в Испании достигает высокого уровня, оно приводит к гибели кроны все большего количества деревьев, а впоследствии — и лесов (Trujillo-Toro, Navarro-Cerrillo, 2019).

Цель настоящей работы — выявить наличие фитоплазменной инфекции в образцах хвои сосны обыкновенной и сосны горной, имевших характерные симптомы заболевания, и определить таксономическую принадлежность фитоплазмы.

² Здесь и далее — номер доступа в базе данных GenBank (Accession number).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

Образцы побегов сосны обыкновенной с симптомами измельчения хвои, низкорослости, повышенной кустистости, с образованиями типа ведьминых метел были собраны в Самарской области в конце мая 2013 г., образцы побегов сосны горной — на территории Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина (Москва) в конце апреля 2019 года. В апреле 2022 г. образцы сосны обыкновенной были взяты в Серебряноборском лесничестве Института лесоведения РАН с двух рядом росших деревьев, одно из них имело внешние признаки инфицированности неизвестным патогеном: иглы хвои в 2 и более раз короче, чем у второго дерева, которое выглядело здоровым. Характеристика всех образцов представлена в табл. и на рис. 1. Из хвои больного дерева из Серебряного Бора приготовили 3 образца, из хвои внешне здорового — 1. Ранее, в 2017 г., у обоих деревьев с использованием инструментальных методов (инфракрасные газоанализаторы) были исследованы морфофизиологические характеристики (дыхание ствола, фотосинтез хвои и водный потенциал хвои) (Молчанов, 2022).

Тотальную ДНК выделяли из 0.5 г хвои каждого образца, которую нарезали ножницами до размера 1 мм или меньше и помещали в морозильную камеру на 16 часов, после чего растирали в фарфоровой ступке с 2.5 мл лизирующего буферного раствора, содержащего 2.5% СТАВ (подробное русскоязычное описание общепринятой методики (Кастальева и др., 2016)).

Аmplификация ДНК и ПДРФ-анализ. ДНК фитоплазмы размером 1.8 Кб амплифицировали с помощью пары праймеров P1/16S-Sr. Полученный ПЦР-продукт использовали в качестве матрицы во



Рис. 1. А — образец хвои сосны обыкновенной: слева — больного дерева с оголенным основанием, укороченной хвоей и образованием бокового ветвления на верхушке, справа — внешне здорового растения. Образцы предоставлены А.Г. Молчановым. Фото Т.Б. Кастальевой, 2022 г. Б — образец хвои больного дерева сосны горной с укороченной хвоей, покраснением концов игл и повышенным ветвлением. Фото Д.З. Богоутдинова, 2018 г.

вложенной (nested) ПЦР с другой парой праймеров — R16F2n/R16R2n. В результате получали специфичный для фитоплазм ампликон размером 1.2 Кб, наличие которого выявляли электрофорезом в 1% агарозном геле. Принадлежность фитоплазмы к подгруппе определяли с помощью анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов. С этой целью нарабатывали необходимое количество ампликона, который подвергали действию эндонуклеаз рестрикции *AluI*, *MseI*, *TaqI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *RsaI*, *Sau3AI*, каждой в отдельности. Продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 5%-ном полиакриламидном геле и сравнивали с эталоном (Duduk et al., 2013).

Таблица. Образцы сосны, проанализированные на наличие фитоплазмы в 2013, 2019 и 2022 гг.

№ образца	Вид сосны	Дата и место сбора образца	Симптомы	Наличие фитоплазмы
1	Сосна обыкновенная	30.05.2013, пгт Кинель Самарской области	Хлороз	–
2	Сосна обыкновенная	То же	Мелкая хвоя с синеватым оттенком	+
3	Сосна обыкновенная	То же	Низкорослость, ведьмина метла	+
4	Сосна горная	22.04.2019, Москва, лес на территории ГБС	Укороченная хвоя	+
5	Сосна горная	22.04.2019, Москва, ГБС, перед лабораторным корпусом	Хлороз и покраснение концов хвои, образование боковых ветвей на верхушках побегов	+
6	Сосна обыкновенная	21.04.2022, Москва, Серебряный Бор	Слабо развитая хвоя на 1/3 части кроны.	+
7	Сосна обыкновенная		То же	+
8	Сосна обыкновенная		То же	+
9	Сосна обыкновенная	21.04.2022, Москва, Серебряный Бор	Ветвь с нормально развитой хвоей от бессимптомного дерева	+

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тотальная ДНК была выделена из всех описанных выше образцов в год сбора образца. Тогда же было проверено наличие в ней фитоплазменной ДНК и предпринята попытка определения принадлежности фитоплазмы к группе и подгруппе, что не всегда удавалось сделать сразу. Из семи проверенных образцов фитоплазма была обнаружена в шести. Образцы № 6, 7 и 8 были взяты с одного дерева. В 2013 г. не удалось установить принадлежность фитоплазмы к группе. Однако благодаря тому, что ДНК фитоплазмы, как правило, хорошо сохраняется при низкой температуре, в 2019 году с использованием более широкого набора эндонуклеаз рестрикции (кроме *AluI* и *MseI*, также *HpaII*, *RsaI*, *TaqI* и *Sau3AI*) было показано, что эта фитоплазма принадлежит к группе 16SrXXI, подгруппе 16SrXXI-A. Тогда же установили наличие фитоплазмы и в образцах сосны горной, принадлежность ее к той же группе и подгруппе (рис. 2).

В апреле 2022 г. на конференции, посвященной обсуждению достижений в области мониторинга состояния древесных растений, одним из авторов этой работы, А.Г. Молчановым, был сделан доклад по результатам морфологического и физиологического исследования состояния “спелых деревьев сосны” (Молчанов, 2022). Эксперимент проводился на двух деревьях примерно одного возраста, одно из которых выглядело больным: примерно на 1/2 части кроны не развивалась хвоя текущего года. В последующие годы здесь наблюдались только годичные лишённые хвои побеги (свечки). Второе дерево выглядело здоровым. Исследования проводили в год появления симптомов заболевания, в 2017 году. Дерево без внешних симптомов использовали в качестве контрольного. У обоих деревьев была определена эмиссия CO₂ с поверхности стволов (дыхание ствола), измерена интенсивность фотосинтеза на хвое второго года и водный потенциал хвои в предрассветные часы. Результаты показали, что интенсивность фотосинтеза больного дерева была несколько ниже, чем у того, которое выглядело здоровым, то же наблюдалось в отношении дыхания ствола. Однако эти различия не были значимыми. Более существенной оказалась разница при определении показателя водосостояния дерева — предрассветного водного потенциала хвои.

Вопрос о том, какая болезнь поразила сосну обыкновенную в эксперименте А.Г. Молчанова, оставался открытым. Автор предполагал, что это могла быть корневая гниль. В то же время картина поражения хвои, наблюдаемая на части кроны больного дерева, — образование мелких боковых побегов с короткой хвоей (рис. 1А) — вполне соответствовала симптоматике, характерной для фитоплазменной инфекции.

В 2019 г. была опубликована работа Morcillo et al., выполненная также в 2017 г. в центральной

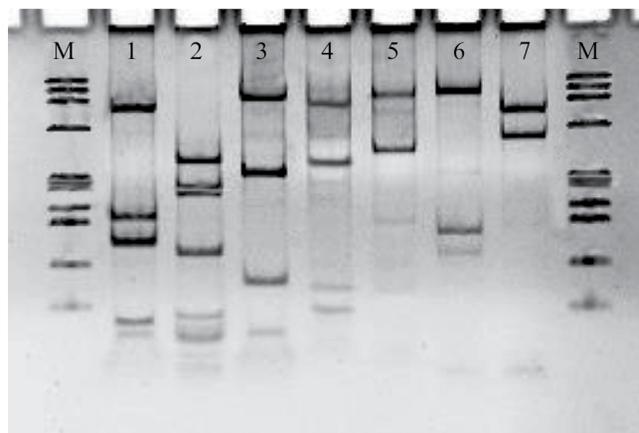


Рис. 2. Электрофоретические профили фрагментов ампликона ДНК 16Sr гена фитоплазмы, выделенной из хвои сосны горной, полученные после обработки эндонуклеазами рестрикции: 1 – *AluI*, 2 – *MseI*, 3 – *HhaI*, 4 – *TaqI*, 5 – *HpaII*, 6 – *HaeIII*, 7 – *RsaI* в 5%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса Φ X174 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas, Lithuania), размер фрагментов сверху вниз (bp): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72. Фото Н.В. Гирсовой, 2019 г.

Испании. В ней оценивались различные морфологические и физиологические показатели, сходные с теми, что измерял А.Г. Молчанов (только на более обширном материале), в том числе и водосостояние деревьев сосны алеппской в непораженных и усыхающих насаждениях деревьев. Для эксперимента было выбрано 48 деревьев, каждое из которых было проверено на наличие фитоплазмы, принадлежащей к группе ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’. Фитоплазма была обнаружена во всех образцах, независимо от наличия симптомов заболевания. Деревья в непораженных насаждениях показали более высокие значения водного потенциала, измеренного в предрассветный период, чем бессимптомные деревья в усыхающих насаждениях, т.е. имели лучшие условия водного режима (Morcillo et al., 2019).

Вложенная ПЦР показала, что все 4 образца из Серебряноборского лесничества, включая образец хвои внешне здорового дерева, содержали целевой продукт — ДНК фитоплазмы. Профили электрограмм фрагментов ДНК после рестрикции ампликона эндонуклеазами *AluI* и *TaqI* в 5%-ном ПААГ соответствовали виртуальному ПДРФ-профилю эталонного (референсного) штамма ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ Pin127S (AJ632155) из Германии, принадлежащего к группе 16SrXXI, виду ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’. ПДРФ-профили, полученные с помощью эндонуклеаз рестрикции *MseI* и *HaeIII* серебряноборского штамма сосны обыкновенной, отличались от эталонного германского штамма Pin127S, но совпадали с профилями литовских штаммов PineLRN и PineBLD (МК089821 и МК089819 соответственно) сосны горной,

идентифицированной как ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ (подгруппа 16SrXXI-A) (рис. 2), что свидетельствовало о более близком родстве российских изолятов фитоплазмы с литовскими.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Это первое сообщение об обнаружении в России случаев инфицирования фитоплазмой группы 16SrXXI видов, родственных ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, сосны обыкновенной и сосны горной. Несмотря на то, что представлены результаты исследования единичных образцов сосны только из Самарской и Московской областей, предполагается, что фитоплазмы на хвойных видах, в том числе на сосне, как и в Европейских странах, могут иметь значительное распространение в Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кастальева Т.Б., Богоутдинов Д.З., Боттнер-Паркер К.Д., Гирцова Н.В., Лу. И.-М. О разнообразии фитоплазмозов сельскохозяйственных культур в России: патогены и их переносчики // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. № 3. С. 367–375. DOI: 10.15389/agrobiology.2016.3.367
- Молчанов А.Г. Мониторинг состояния спелых деревьев сосны — морфофизиологические и инструментальные подходы (фотосинтез хвои, дыхание стволов, предсветный водный потенциал) // Мониторинг и биологические методы контроля вредителей и патогенов древесных растений: от теории к практике: Мат. 3-й Всерос. конф. с междунар. участием. М.; Красноярск: ИЛ СО РАН, 2022. С. 101–102.
- Cai W., Shao J., Zhao Y., Davis R.E., Costanzo S. Draft genome sequence of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’-related strain MDPP: A resource for comparative genomics of gymnosperm-infecting phytoplasmas // Plant Disease. 2020. V. 104. P. 1009–10.
- Costanzo S., Rascoe J., Zhao Y., Davis R., Nakhla M.K. First report of a new ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’-related strain associated with witches’-broom of *Pinus* spp. in Maryland // Plant Disease. 2016. V. 100. № 8. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0097-PDN>
- Duduk B., Paltrinieri S., Lee I.-M., Bertaccini A. Nested PCR and RFLP Analysis Based on the 16S rRNA Gene // Methods and Protocols Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2013. 938: 159–170.
- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A., Terauchi R., Kaimoun S. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms // Molecular Plant-Microbe Interaction. 2009. V. 22. P. 115–22.
- Huang S., Tiwari A.K., Rao G.P. ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ affecting *Taxodium distichum* var. *imbricarium* in China [Abstract]. Phytopathogenic Mollicutes. 2011. V. 1. № 2. P. 91–94.
- Ivanauskas A., Rimsaite J., Danilov J., Soderman G., Sneideris D., Zizyte-Eidetiene M., Wei W., Valiunas D. A Survey of Potential Insect Vectors of Mountain Pine Proliferation Decline Phytoplasma in Curonian Spit, Lithuania // Environmental Sciences Proceedings. 2021. V. 3. № 1. P. 81. <https://doi.org/10.3390/IECF2020-07977>
- Iwabuchi N., Kitazawa Y., Maejima K., Koinuma H., Miyazaki A., Matsumoto O., Suzuki T., Nijo T., Oshima K., Namba S., Yamaji Y. Functional variation in phylogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism // Molecular Plant Pathology. 2020. V. 21. P. 1322–1336. <https://doi.org/10.1111/mpp.12981>
- Ježić M., Poljak I., Šafarić B., Idžojić M., Ćurković-Perica M. 2013. ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ in pine species in Croatia // Journal of Plant Diseases and Protection. V. 120 P. 160–163. <https://doi.org/10.1007/BF03356469>
- Kaminska M., Berniak H. Detection and identification of three ‘*Candidatus Phytoplasma*’ species in *Picea* spp. trees in Poland // Journal of Phytopathology. 2011. V. 159. P. 796–798.
- Kamińska M., Bernia K.H., Obdrzalek J. 2011. New natural host plants of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ in Poland and the Czech Republic // Plant Pathology. 2011. V. 60. P. 1023–1029. DOI: 10.1111/j.1365–3059.2011.02480.x
- Marcone C. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas // Annals of Applied Biology. 2014. V. 165. P. 199–221. DOI: 10.1111/aab.12151
- Morcillo L., Gallego D., González E., Vilagrosa A. Forest Decline Triggered by Phloem Parasitism-Related Biotic Factors in Aleppo Pine (*Pinus halepensis*) // Forests. 2019. V. 10. № 8. P. 608. <https://doi.org/10.3390/f10080608>—24 Jul 2019.
- Namba S. Molecular and biological properties of phytoplasmas // Proceedings of the Japan Academy. Series B: Physical and Biological Sciences. 2019. V. 95. P. 401–418. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>
- Oshima K., Maejima K., Isobe Y., Endo A., Namba S., Yamaji Y. Molecular mechanisms of plant manipulation by secreting effectors of phytoplasmas // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2023. V. 125. № 3: 102009. DOI: 10.1016/j.pmp.2023.102009
- Paltrinieri S., Pondrelli M., Bertaccini A. X-disease-related phytoplasmas in ornamental trees and shrubs with witches’ broom and malformation symptoms // Journal of Plant Pathology. 1998. V. 80. P. 261.
- Rashid U., Bilal S., Bhat K.A., Shah T.A., Wani T.A., Bhat F.A., Mughal M.N., Nargis Nazir. Phytoplasma Effectors and their Role in Plant-Insect Interaction // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018. V. 7. № 2. P. 1136–1148. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcm.2018.702.141>
- Schneider B., Torres E., Martin M.P., Schröder M., Behnke H.-D., Seemüller E. ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. V. 55. P. 303–307. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63285-0>
- Śliwa H., Kaminska M., Korszun S, Adler P. Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ in *Pinus sylvestris* trees in Poland // Journal of Phytopathology. 2008. V. 156. № 2. P. 88–92. DOI: 10.1111/j.1439–0434.2007.01335.x
- Trujillo-Toro J., Navarro-Cerrillo R.M. Analysis of Site-dependent *Pinus halepensis* Mill. Defoliation Caused by ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ through Shape Selection in Landsat Time // Series Remote Sensing. 2019. V. 11. № 16. P. 1868. <https://doi.org/10.3390/rs11161868>

Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Urbonaite I., Sneideris D. and Davis R. E. Molecular identification of phytoplasmas infecting diseased pine trees in the UNESCO-protected Curonian Spit of Lithuania // Forests. 2015. V. 6. № 7. P. 246–2483.
<http://www.mdpi.com/1999-4907/6/7/2469/htm>
 doi: 10.3390/f6072469

Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Sneideris D., Zizyte-Eidetiene M., Shao J., Zhao Yan, Costanzo S., Davis R.E. Rapid detection and identification of ‘Candidatus Phytoplasma pini’-related strains based on genomic markers present in 16S rRNA and tuf genes // Forest Pathology. 2019. V. 49. № 6. e12553.
<https://doi.org/10.1111/efp.12553>

Detection of Phytoplasma belonging to the 16SrXXI group in Scott pine and mountain pine

N.V. Girsova^a, D.Z. Bogoutdinov^a, A.G. Molchanov^b, T.B. Kastalyeva^a, *

^aAll-Russian Research Institute of Phytopathology. Ul. Institute, building 5, Bolshiye Vyazemy, Odintsovo, Moscow region, 143050 Russia

^bInstitute of Forest Science, Russian Academy of Sciences, ul. Sovetskaya 21, Uspenskoe, Odintsovo, Moscow region, 143030 Russia

*E-mail: kastalyeva@yandex.ru

One of the reasons for the deterioration of coniferous stands condition in a number of European countries is associated with their infection with phytoplasmas (obligate intracellular pathogens) — bacteria lacking a cell wall. The aim of the work is to identify the presence of phytoplasma infection in samples of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and mountain pine (*Pinus mugo* Turra) collected in the Moscow and Samara regions, which had characteristic symptoms of the disease, and to determine the taxonomic affiliation of the phytoplasma. Phytoplasma was detected using direct and nested PCR with primer pairs P1/16S-Sr and R16F2n/R16R2 respectively. Phytoplasma DNA was found in six of the seven pine specimens, including an asymptomatic one. Analysis of restriction fragment length's polymorphism after digestion of DNA amplicons with restriction endonucleases *AluI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *HaeIII*, *RsaI*, and *TaqI* indicated the similarity of Russian strains of Scotch pine and mountain pine phytoplasmas to Lithuanian strains of PineLRN and PineBLD of mountain pine phytoplasma (GenBank Accession Number MK089821 and MK089819, respectively) identified as ‘Candidatus Phytoplasma pini’ (subgroup 16SrXXI-A). A phytoplasma related to this species has been registered on the territory of the Russian Federation for the first time.

Key words: Scots pine (*Pinus sylvestris*), mountain pine (*P. mugo*), phytoplasma, ‘Candidatus Phytoplasma pini’.

Acknowledgements: The research was carried out within the framework of the theme of the RAS state assignment 0598-2019-0002.

REFERENCES

- Cai W., Shao J., Zhao Y., Davis R.E., Costanzo S., Draft genome sequence of ‘Candidatus Phytoplasma pini’-related strain MDPP: A resource for comparative genomics of gymnosperm-infecting phytoplasmas, *Plant Disease*, 2020, Vol. 104, pp. 1009–1010.
- Costanzo S., Rascoe J., Zhao Y., Davis R., Nakhla M.K., First report of a new ‘Candidatus Phytoplasma pini’-related strain associated with witches’-broom of *Pinus* spp. in Maryland. *Plant Disease*, 2016, Vol. 100, No. 8.
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0097-PDN>
- Duduk B., Paltrinieri S., Lee I.-M., Bertaccini A., Nested PCR and RFLP Analysis Based on the 16S rRNA Gene, In: *Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2013, 938, pp. 159–170.
- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A., Terauchi R., Kaimoun S., Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms, *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2009, Vol. 22, pp. 115–222.
- Huang S., Tiwari A.K., Rao G.P., ‘Candidatus Phytoplasma pini’ affecting *Taxodium distichum* var. *imbricarium* in China [Abstract], *Phytopathogenic Mollicutes*, 2011, Vol. 1, No. 2, pp. 91–94.
- Ivanauskas A., Rimsaite J., Danilov J., Soderman G., Sneideris D., Zizyte-Eidetiene M., Wei W., Valiunas D., A Survey of Potential Insect Vectors of Mountain Pine Proliferation Decline Phytoplasma in Curonian Spit, Lithuania, *Environmental Sciences Proceedings*, 2021, Vol. 3, No. 1, p. 81.
<https://doi.org/10.3390/IECF2020-07977>
- Iwabuchi N., Kitazawa Y., Maejima K., Koinuma H., Miyazaki A., Matsumoto O., Suzuki T., Nijo T., Oshima K., Namba S., Yamaji Y., Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism, *Molecular Plant Pathology*, 2020, Vol. 21, pp. 1322–1336.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12981>
- Ježić M., Poljak I., Šafarić B., Idžojtić M., Čurković-Perica M., ‘Candidatus Phytoplasma pini’ in pine species in Croatia, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2013, Vol. 120, pp. 160–163.
<https://doi.org/10.1007/BF03356469>

- Kamińska M., Bernia K.H., Obdrzalek J., New natural host plants of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ in Poland and the Czech Republic, *Plant Pathology*, 2011, Vol. 60, pp. 1023–1029. DOI: 10.1111/j.1365–3059.2011.02480.x
- Kaminska M., Berniak H., Detection and identification of three ‘*Candidatus Phytoplasma*’ species in *Picea* spp. trees in Poland, *Journal of Phytopathology*, 2011, Vol. 159, pp. 796–798.
- Kastal’eva T.B., Bogoutdinov D.Z., Bottner-Parker K.D., Girsova N.V., Li I.-M., O raznoobrazii fitoplazmozov sel’skohozyaistvennykh kul’tur v Rossii: patogeny i ih perenoschiki (Diverse phytoplasmas associated with diseases in various crops in Russia — pathogens and vectors), *Sel’skohozyaistvennaya biologiya*, 2016, Vol. 51, No. 3, pp. 367–375.
- Marcone C., Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas, *Annals of Applied Biology*, 2014, Vol. 165, pp. 199–221. DOI: 10.1111/aab.12151
- Molchanov A.G., Monitoring sostoyaniya spelyh derev’ev sosny — morfofiziologicheskie i instrumental’nye podhody (fotosintez hvoi, dyhanie stvolov, predrassvetnyi vodnyi potencial (Monitoring the condition of mature pine trees — morphophysiological and instrumental approaches (photosynthesis of needles, trunk respiration, pre-dawn water potential)), *Monitoring i biologicheskie metody kontrolya vreditelei i patogenov drevesnykh rastenii: ot teorii k praktike* (Monitoring and biological methods for controlling pests and pathogens of woody plants: from theory to practice), Proc. of 3rd All-Russian Conf. with international participation, Moscow-Krasnoyarsk: IL SO RAN, pp. 101–102.
- Morcillo L., Gallego D., González E., Vilagrosa A., Forest Decline Triggered by Phloem Parasitism-Related Biotic Factors in Aleppo Pine (*Pinus halepensis*), *Forests*, 2019, Vol. 10, No. 8, p. 608. <https://doi.org/10.3390/f10080608>—24 Jul 2019.
- Namba S., Molecular and biological properties of phytoplasmas, *Proceedings of the Japan Academy*, Series B: Physical and Biological Sciences, 2019, Vol. 95, pp. 401–418. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>
- Oshima K., Maejima K., Isobe Y., Endo A., Namba S., Yamaji Y., Molecular mechanisms of plant manipulation by secreting effectors of phytoplasmas, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2023, Vol. 125, No. 3: 102009. DOI: 10.1016/j.pmpp.2023.102009
- Paltrinieri S., Pondrelli M., Bertaccini A., X-disease-related phytoplasmas in ornamental trees and shrubs with witches’ broom and malformation symptoms, *Journal of Plant Pathology*, 1998, Vol. 80, p. 261.
- Rashid U., Bilal S., Bhat K.A., Shah T.A., Wani T.A., Bhat F.A., Mughal M.N., Nargis Nazir, Phytoplasma Effectors and their Role in Plant-Insect Interaction, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, Vol. 7, No. 2, pp. 1136–1148. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.141>
- Schneider B., Torres E., Martin M.P., Schröder M., Behnke H.-D., Seemüller E., ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, a novel taxon from *Pinus sylvestris* and *Pinus halepensis*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, Vol. 55, pp. 303–307. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63285-0>
- Śliwa H., Kaminska M., Korszun S, Adler P., Detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ in *Pinus sylvestris* trees in Poland, *Journal of Phytopathology*, 2008, Vol. 156, No. 2, pp. 88–92. DOI: 10.1111/j.1439–0434.2007.01335.x
- Trujillo-Toro J., Navarro-Cerrillo R.M., Analysis of Site-dependent *Pinus halepensis* Mill. Defoliation Caused by ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’ through Shape Selection in Landsat Time, *Series Remote Sensing*, 2019, Vol. 11, No. 16, p. 1868. <https://doi.org/10.3390/rs11161868>.
- Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Urbonaite I., Sneideris D. and Davis R.E., Molecular identification of phytoplasmas infecting diseased pine trees in the UNESCO-protected Curonian Spit of Lithuania, *Forests*, 2015, Vol. 6, No. 7, pp. 2469–2483, available at: <http://www.mdpi.com/1999-4907/6/7/2469/htm>. DOI: 10.3390/f6072469.
- Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Sneideris D., Zizyte-Eidetiene M., Shao J., Zhao Yan, Costanzo S., Davis R.E., Rapid detection and identification of ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’-related strains based on genomic markers present in 16S rRNA and tuf genes, *Forest Pathology*, 2019, Vol. 49, No. 6, e12553. <https://doi.org/10.1111/efp.12553>