

УДК 635. 92 9 (476)

ВИДОВОЙ СОСТАВ ВИРУСОВ, ПОРАЖАЮЩИХ ТЮЛЬПАНЫ В УСЛОВИЯХ ПРИДНЕСТРОВЬЯ

Ольга Олеговна Тимина¹, Людмила Григорьевна Ионова¹, Олег Юрьевич Тимин²

¹Приднестровский государственный университет им.Т.Г.Шевченко
3300, Молдова, Приднестровье, г. Тирасполь, Ул. 25 Октября 107
E-mail: otimina@mail.ru

²Республиканский НИИ экологии и растительных ресурсов
3200, Молдова, Приднестровье, г Бендеры, Каховский тупик 2
E-mail: otimin@mail.ru

Впервые изучался видовой состав вирусов, поражающих тюльпаны в условиях Приднестровья, и их распространение в коллекционном питомнике, включающем и ряд видовых тюльпанов. Состав вирусов определяли визуально по симптомам проявления, на растениях-индикаторах и иммунохроматографически (Agdia biofords, США). Диагностированы: вирус пестролепестности (25%), вирус некроза табака (5%) и вирус погремковости табака (1%). На провокационном фоне по пестролепестности выявлена дифференциация поражаемости образцов, лучшие из которых будут использованы в дальнейшей работе.

Ключевые слова: тюльпаны; вирозы; диагностика; провокационный фон.

Введение

Известно, что тюльпаны восприимчивы более чем к 20 различным вирусам [8–12]. Однако состав вирусов, распространенных на культуре в конкретной зоне выращивания, хотя и варьирует, но, как правило, специфичен в зависимости от генотипа сорта, факторов среды, наличия резерваторов вирусов, их переносчиков и общей фитопатологической обстановки, сложившейся в районах выращивания. В Молдавии с середины 70-х годов прошлого столетия посадки тюльпанов были сосредоточены в основном в правобережье в защищенном грунте и были предназначены на срезку. В связи с переходом цветоводства Молдавии на промышленную основу с середины 70-х годов возникли проблемы и вызовы, связанные с монокультурой, интенсивной интродукцией, вегетативным размножением, и значительным распространением вредителей и болезней цветочных культур. Поэтому была проведена большая работа [3] по идентификации наиболее опасных вирусных болезней тюльпанов в основном в защищенном грунте, в результате которой были выявлены вирус пестролепестности (TBV), вирус огуречной мозаики (CMV), вирус погремковости табака (TRV). Однако, в последующем за более чем 30 – летний период состав вирусов, поражающих культуру, больше не уточнялся. Но за этот период спектр вирусов мог трансформироваться в связи с интродукцией новых сортов, изменениями климата и общей фитосанитарной обстановкой в регионе. Кроме того, изыскания 80-х годов не касались Приднестровья, где возможный состав вирусов вообще не изучался. Поэтому целью наших исследований явилось изучение видового состава возбудителей вирусных болезней тюльпанов в условиях Приднестровья. В задачи исследований входило: изучение симптомов вирозов, уточнение видового состава патогенов и их распространение в коллекционном питомнике, оценка поражаемости сортов и ряда видовых тюльпанов наиболее распространенным возбудителем.

Объекты и методы исследования

В настоящее время материал в коллекционном питомнике представлен 48 сортообразцами в основном голландской селекции, принадлежащими к 13 садовым классам, включая сорта на основе видов Кауфмана, Грейга, а также некоторые видовые тюльпаны: *Tulipa tarda* Stapf, *T. turkestanica* (Regel) Regel, *T. biebersteiniana* Schult.& Schult.fil, *T. urumiensis* Stapf, *T. iliensis* Regel. Растения выращивали на коллекционном участке в Слободзейском районе, центральная часть Приднестровья в открытом грунте в соответствии с общепринятыми требованиями технологии и агротехники культуры тюльпана на капельном орошении в 2013–2017 гг. [2]. Коллекционная оценка проводилась согласно методике государственного сортоиспытания цветочных культур Российской Федерации [1].

Видовой состав вирусов изучался визуально по характерным симптомам на больных растениях, а также с помощью растений индикаторов и иммунохроматографически с использованием диагностических наборов стрип – полосок производства фирмы Agdia biofords (США). Для идентификации использовали стрипы на вирус пестролепестности (TBV), вирус мозаики резухи (ArMV), вирус табачной мозаики (TMV), вирус огуречной мозаики (CMV), вирус бронзовости томатов (TSWV). Идентификацию возбудителя проводили согласно инструкции. В рифленый стандартный пакет с буфером помещали кусочек исследуемой ткани и измельчали ее с помощью твердого тубуса, в котором хранились тестирующие полоски, надавливая на пакет. В полученную взвесь (Рис.1) опускали диагностирующий стрип и в течение 5–30 минут следили за появлением окрашенных маркерных полосок. Две полосы в верхней части стрипа свидетельствовали о наличии вируса, одна – об его отсутствии. Видовая принадлежность вируса обозначена на верхней части стрипа.

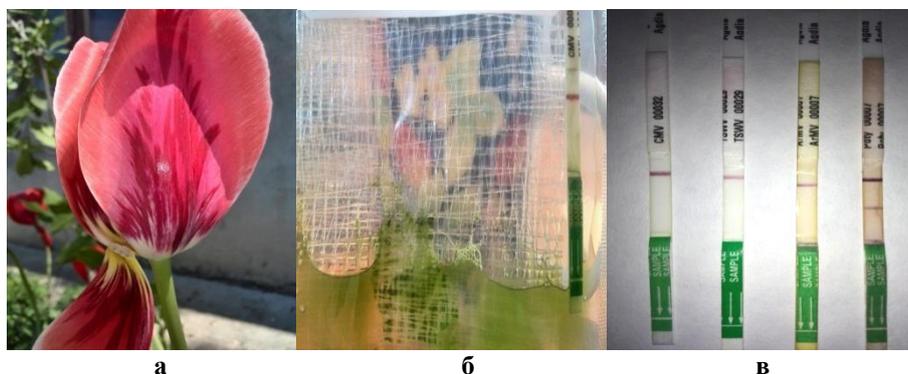


Рис. 1 Результаты тестирования возбудителя мозаики на сорте Antwerp.

- а) Больное растение с симптомами мозаики
 б) Измельченный в буфере кусочек листа в пакете и стрип с отрицательным результатом на CMV.
 в) Отрицательный результат на CMV, TSWV и ArMV и положительный на TBV

Вирус некроза табака (TNV) и вирус погремковости табака (TRV) определяли только визуально по совокупности симптомов и методом растений индикаторов в виду отсутствия соответствующих тест стрипов.

Для достоверной оценки болезнеустойчивости создали провокационный фон, высаживая на отдельном участке луковицы мозаичных тюльпанов, где в дальнейшем размещали и часть луковиц испытуемых сортов. Учитывали % заболевших растений и интенсивность проявления симптомов в баллах по 4-х балльной шкале с 0 (Рис.2). Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами [5].

Результаты и обсуждение

1. Симптоматика вирусных заболеваний и их диагностика

Известно, что симптомы вирусных заболеваний на тюльпанах подразделяются на мозаичные, а также связанные с угнетением роста и развития растения, и с изменением формы и размеров различных органов [3, 7–12]. Первый тип обуславливает пестролистность, обесцвечивание, крапчатость, штриховатость, полосатость и т.п., второй - симптомы в виде задержки роста и развития, появления некрозов, усыхания, третий - с деформациями цветков и листьев, уменьшения их размеров, а также и луковиц с последующим возможным полным вырождением сорта. Симптомы вирусозов на тюльпанах являются достаточно специфичными и по совокупности внешних признаков заболевания обуславливают первичную, хотя и предварительную диагностику вида возбудителя. Визуальное обследование коллекционного питомника выявило различные типы симптомов на коллекционных образцах тюльпанов, однако, преобладала мягкая мозаика на листьях, интенсивная - на лепестках (рис. 2, рис. 3).

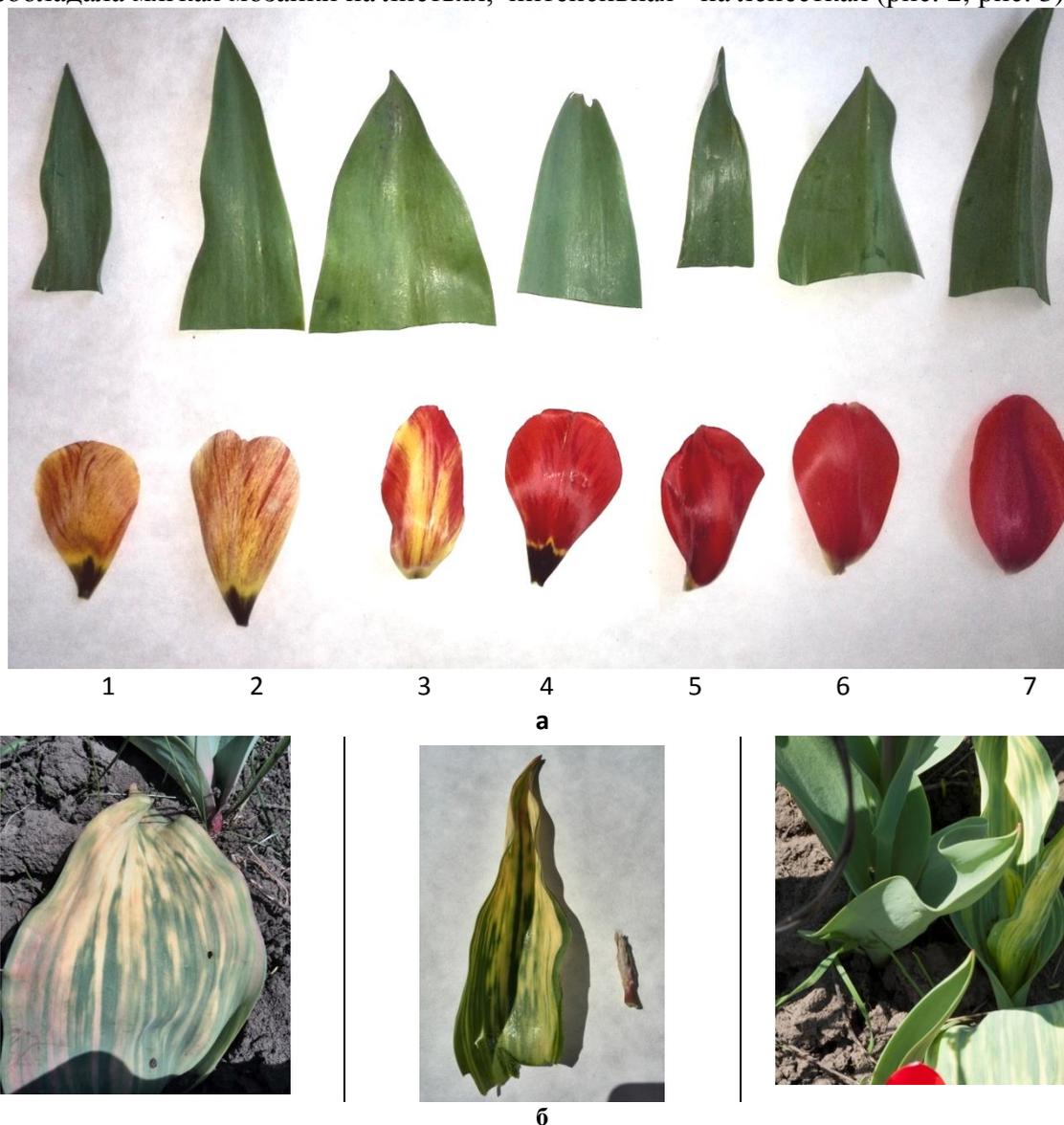


Рис. 2 Различные типы мозаичных заболеваний на тюльпанах.

- а) Интенсивность проявления пестролепестности на лепестках и листьях в баллах на провокационном фоне, где 1-3 соответствует 4 баллам; 4-5 – 3 баллам; 6-7 – 1 баллу;
 б) Белая полосатость (TRV). Растущие рядом растения не заражаются.

Больные растения с интенсивной мозаичностью листьев (рис. 2), а также и с некрозами на листьях (рис. 3) выявлялись спорадически. Согласно литературным данным [3,7–12] мягкая мозаика на листьях и интенсивная на лепестках вызывается TVV, что соответствовало и нашим результатам стрип – диагностики. Хотя стрип диагностика устанавливает только видовую принадлежность возбудителя без количественных показателей в растении, ее точность по данным разработчиков Agdia biofords не уступает ELISA-тесту, и имеет преимущества в скорости получения результатов, в отсутствии необходимости наличия особого оборудования, расходных материалов и специально обученного персонала. Кроме того, стоимость этого теста в 10 раз дешевле ELISA-теста или ПЦР.



Рис. 3 Задержка развития, деформация и некротизация листьев преимущественно на одной половине листа

Наши данные по индикаторной диагностике и определения поражения по внешним признакам свидетельствовали о том, что мозаика “белая полосатость” вызывается TRV, что совпадает с литературными данными [3, 8]. Возбудитель бурой пятнистости с последующей некротизацией ткани и общей задержкой развития на тест растениях определялся как TNV (табл. 1).

Таблица 1

Симптомы заболевших растений тюльпана и диагностика возбудителя на тест-растениях

Симптомы на тюльпане	Тест растения	Симптомы на тест растениях	Возбудитель
Белая полосатость на листьях, лепестках, деформации и уродливость цветка	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Cucumis sativus</i> L. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd <i>Nicotiana tabacum</i> L. Samsun	N LL Chl LL N N LL SMN	Вирус погрелковости табака (TRV)
Бурые пятна на листьях. Располагаются на половине листа. Постепенно высыхают и некротизируются. (Августовская болезнь)	<i>C. quinoa</i> <i>N. alata</i> Link et Otto <i>N. tabacum</i> . <i>Tetragonia expansa</i> Murr	Chl LL N LL N LL Chl LL	Вирус некроза табака (TNV)

Примечания

LL – местная реакция; Chl LL – местные хлоротические пятна; N LL – местные некрозы; 0 – отсутствие видимых симптомов; SMN – системная некротическая мозаика

Следует отметить, что рядом с коллекционным материалом тюльпанов располагался участок по размножению картофеля и другими овощными культурами.

Возможно, неблагоприятное расположение коллекционного питомника и спровоцировало появление мозаичных заболеваний на тюльпанах. И белая полосатость, и Августовская болезнь относятся к природно-очаговым заболеваниям, развитие которых тесно связано с наличием соответствующих векторов или переносчиков вирусов. TNV переносится грибом *Olpidium brassicae* (Woronin) P.A. Dang, TRV – нематодами родов *Paratrichodorus* и *Trichodorus* [4]. Нематоды *Paratrichodorus* и *Trichodorus* способны переносить кроме TRV также и возбудителей раннего побурения гороха и кольцевой пятнистости перца [4]. Учитывая, что радиус миграции *O. brassicae* не превышает 1,5–3 м, а нематод – максимально 10 м, можно избежать поражения вирусами TNV и TRV при размещении тюльпанов вдали от общих хозяев векторов инфекции и на участках, лишенных переносчиков. Изучение распространения вирусов в коллекционном питомнике на естественном фоне показало значительное превалирование вируса пестролепестности (табл.2) и отсутствие видимых поражений у видовых тюльпанов.

Таблица 2

Распространение различных типов виروزов тюльпанов в коллекционном питомнике, 2013–2014 гг., естественный фон

№	Классы тюльпанов	Количество исследованных образцов	Частота встречаемости виروزов в группе, %		
			Пестролепестность	Августовская болезнь	Белая полосатость
<i>Группа I. Раноцветущие тюльпаны</i>					
1	Простые ранние	1	0	0	0
2	Махровые ранние	5	0	0	0
<i>Группа II. Среднецветущие тюльпаны</i>					
3	Триумф-тюльпаны	11	18	1	5
4	Дарвиновы гибриды	5	15	0	0
<i>Группа III. Поздноцветущие тюльпаны</i>					
5	Простые поздние	2	25	0	0
6	Лилиецветные	5	20	0	0
7	Бахромчатые	6	14	0	0
8	Зеленоцветковые	2	10	0	0
9	Попугайные	2	10	0	0
10	Махровые поздние	4	10	0	0
<i>Группа IV. Виды тюльпанов и их гибриды</i>					
11	Тюльпан Кауфмана, разновидности и гибриды	2	0	0	0
12	Тюльпан Грейга, разновидности и гибриды	1	0	0	0
13	<i>T. tarda</i>	1	0	0	0
	<i>T. turkestanica</i>	1	0	0	0
	<i>T. biebersteiniana</i>	1	0	0	0
	<i>T. urumiensis</i>	1	0	0	0
	<i>T. iliensis</i>	1	0	0	0

Для уточнения устойчивости изучаемого материала к вирусу пестролепестности провели фитопатологическую оценку поражаемости также и на провокационном фоне. Устойчивость видовых тюльпанов и наличие латентной инфекции проверяли с помощью стрип тестирования.

2. Поражаемость пестролепестностью различных классов тюльпанов на естественном и провокационном фонах

Фитопатологическая оценка изучаемых сортов тюльпана выявила дифференциацию поражаемости как в условиях естественного заражения, так и на провокационном фоне. В условиях провокационного фона отмечалось постепенное усиление инфицированности как за счет увеличения числа зараженных растений, так и увеличения балла поражения. Сильнее всего поражались средне- и поздноцветущие генотипы. Видовые тюльпаны практически не поражались пестролепестностью в условиях провокационного фона на третий год испытаний без ежегодной выкопки.

Таблица 2

Поражаемость пестролепестностью различных классов тюльпанов 2014-2017 гг.

Классы	Пестролепестность			
	Естественный фон		Провокационный фон	
	% больных	Средний балл поражения	% больных	Средний балл поражения
<i>Группа I. Ранозацветающие тюльпаны</i>				
Простые ранние	0	0	0	0
Махровые ранние	0	0	0	0
<i>Группа II. Среднезацветающие тюльпаны</i>				
Триумф-тюльпаны	18	0,5±0,05	20	0,7±0,03
Дарвиновы гибриды	15	0,6±0,04	21	0,8±0,03
<i>Группа III. Позднозацветающие тюльпаны</i>				
Простые поздние	25	2,3±0,01	25	2,5±0,03
Лилиецветные	20	0,4±0,01	20	0,7±0,02
Бахромчатые	14	2,0±0,02	16	2,5±0,04
Зеленоцветковые	10	0,4±0,01	10	0,4±0,02
Попугайные	10	0,3±0,05	10	0,3±0,03
Махровые поздние	10	0,7±0,05	10	0,8±0,01
<i>Группа IV. Виды тюльпанов и их гибриды</i>				
Тюльпан Кауфмана, разновидности и гибриды	0	0	0	0
Тюльпан Грейга, разновидности и гибриды	0	0	0	0
<i>T. tarda</i>	0	0	0	0

Продолжение таблицы 2

<i>T. turkestanica</i>	0	0	0	0
<i>T. beibersteiniana</i>	0	0	0	0
<i>T. urumiensis</i>	0	0	0	0
<i>T. iliensis</i>	0	0	0	0

Стрип тестирование на латентное носительство TBV дало также отрицательные результаты (табл.3).

Таблица 3

Результаты анализа наличия латентной инфекции у видовых тюльпанов с помощью стрип-диагностики

№	Образец	Исследуемый материал	Наличие симптомов	Наличие маркера на стрипе через 5-30 минут		
				Контрольного	Вирусного	Неспецифической реакции
1	'Crystal Beauty' (положительный контроль)	лепесток	пестролепестность	++	++	-
		лист	слабая штриховатость	++	++	-
		чешуя луковицы	без симптомов	++	+	-
2	'Иоганн Штраус'	лист	-“-	+	-	-
3	<i>T. tarda</i>	-“-	-“-	+	-	-
4	<i>T. turkestanica</i>	-“-	-“-	+	-	-
5	<i>T. beibersteiniana</i>	-“-	-“-	+	-	-
6	<i>T. urumiensis</i>	-“-	-“-	+	-	-
7	<i>T. iliensis</i>	-“-	-“-	+	-	-

Среди испытуемых видовых тюльпанов *T. beibersteiniana* является ресурсным видом и образует естественные плантации на севере республики. Вид очень пластичный, в Приднестровье он представлен лесной и степной формами, хорошо приспособлен к местным условиям, где репродуцируется половым (не каждый год) и вегетативным способом. Растения этого вида декоративны, их можно, не выкапывая ежегодно, успешно использовать в садово-парковом строительстве. Представляет интерес и другие видовые тюльпаны, в том числе и как источники устойчивости к вирусу пестролепестности. В текущем году были успешно получены межвидовые гибриды представителей Триумф тюльпанов с *T. tarda*, с которыми будет проведена дальнейшая селекционная работа. По совокупности декоративных признаков и устойчивости к заболеваниям лучшими среди сортов в условиях Приднестровья по предварительным данным являются представители классов Махровых ранних ('Император') и Триумф тюльпанов ('Tom Pouce' и 'Princes Irene').

Таким образом, проведенные исследования уточнили видовой состав вирусов в Приднестровье на коллекционных образцах тюльпанов, выявили преобладающего возбудителя и дифференцировали имеющийся генофонд по поражаемости этим патогеном на провокационном фоне. Начата селекционная работа по интродукции устойчивости в перспективные садовые формы, восприимчивые к болезни.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность профессору Балашовой И.Т. (Всероссийский институт селекции и семеноводства овощных культур) за поддержку, плодотворное обсуждение полученных результатов и предоставление стрип-диагностикумов для проведения анализов.

Список литературы

1. *Былов В.Н.* Основы сортоизучения и сортооценки декоративных растений при интродукции // Бюлл. Глав. Ботан. сада АН СССР. – 1971. – Вып. 81. – С. 69 – 77.
2. *Вакуленко В.В., Зайцева Е.Н., Клевенская Т.М., Кудрявец Д.Б., Николаенко Н.П., Порубиновская Г.В., Сурина Е.И.* Справочник цветовода. / Составитель Николаенко Н.П. – 3-е изд., стереот. – М.: Колос, 2001. – 448 с.
3. *Волощук Л.Ф.* Вирусные болезни гвоздик и тюльпанов в Молдавской ССР и обоснование мер борьбы с ними: Автореф. дисс...канд.биол. наук: 06.01.11 / Всесоюзный НИИ защиты растений, отдел генетики растений АН МССР. – Кишинев, 1985. – 24 с.
4. *Козырева Н.И.* Нематоды семейства Trichodoridae и их роль в распространении вирусных болезней на картофеле в Московской области: Автореф. дисс...канд биол. наук: 03.00.19 / Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н.Северцова РАН. – Москва, 2008. – 24 с.
5. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.:Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 6. (Декоративные культуры). – М.: Колос, 1968. – 222 с.
7. *Плугатарь Ю.В., Клименко З.К.* Современное состояние интродукционных и селекционных исследований многолетних цветочно-декоративных растений в Никитском ботаническом саду // Сборник научных трудов ГНБС. – 2014. Т. 136. – С.5-20.
8. *Asjes C.J.* Virusis in tulip in the Netherlands // Acta Horticulture. – 1994. – Vol. 377. – P.289-300.
9. *Morikawa T., Taga Y., Moril T.* Resistance of tulip cultivars to mild mottle mosaic disease// Acta Horticulture. – 2005. – №. 673. – P.549 – 553.
10. *Mowat W.P.* Tulip. // Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops / Eds. Loebenstein G., Lawson R.H., Brunt A.A. – Chichester, New York, Brisbane.: John Wiley & Sons, 1995. – P.352 – 383.
11. *Sochacki D.* The occurrence of the viruses in tulip crops in Poland // Journal of Horticultural Research. - 2013. – Vol. 21, № 1. – P. 5 – 9.
12. *Rivas E.B., Galleti S.A., Alecsandre M.A.V., Duarte L.M.L., Chagas C.M.* Interception of virusis on foreign tulips in Brazil // Arq. Inst. Biol. São Paulo. – 2009. – Vol.76, № 3. – P.501 – 504

Timina O.O., Ionova L.G., Timin O.Y. Tulips viruses composition in Transdnistria // Works of State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – V. 145 – P. 297-304.

Species composition of the viruses which damage tulips and their propagation in the collection nursery was studied for the first time in Transdnistria. The collection nursery included the series of specific tulips. The classification of viruses was defined visually on the symptoms manifestation of the affected plants, with the aid of the indicators plants and also by immune - chromatographic diagnostic Agdia's viruses Flashkits production of firm Agdia biofords (USA). Viruses were diagnosed as following: the tulip breaking virus (TBV) (25%), Tobacco necrosis virus (TNV) (5%) and tobacco rattle virus (TRV) (1%). The differentiation of the vulnerability of the samples was revealed on the provocative background of the TBV. The best of genotypes will be used in further work.

Keywords: tulips; viral diseases; diagnostics; provocative background.