

УДК 632.3.07:[633.49+635.64

## РАЦИОНАЛЬНЫЕ СОЧЕТАНИЯ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТОВ

В. А. ШМЫГЛЯ

(Кафедра фитопатологии)

Одним из важнейших условий успешной разработки и применения систем защитных мероприятий против вирусных болезней культурных растений является повышение достоверности методов их диагностики.

Известно, что точность всех известных методов диагностики вирусов относительна и зависит от принципа каждого метода, особенностей живого объекта и конкретных условий до анализа и во время него. В настоящее время проводимая во многих странах работа, целью которой является повышение достоверности диагностики, идет главным образом по пути увеличения чувствительности методов анализа. Однако все больше накапливается фактов, указывающих на то, что достоверность диагностики зависит не только от чувствительности методов, но и от особенностей вирусов как биологических объектов.

В настоящей статье предпринимается попытка систематизировать имеющиеся литературные и собственные данные по проблеме достоверности диагностики вирусов растений и уточнить зависимость ее результатов от характера инфекционного процесса и состояния вируса в исследуемом материале на примере М-вируса картофеля (МВК), вируса скручивания листьев картофеля (ВСКЛ) и вируса табачной мозаики (ВТМ) на томатах.

### Диагностика вируса М картофеля

Вирус М — возбудитель мозаичного закручивания листьев и тяжелой мозаики картофеля — имеет ряд биологических особенностей, существенно влияющих на его диагностику. Этот вирус может длительное время, иногда в течение нескольких клубневых репродукций, находиться в состоянии, недоступном для серодиагностики, хотя окружающие условия не препятствуют его накоплению [5, 8]. Как правило, визуальные симптомы заражения при этом также отсутствуют. Вместе с тем обычно сорта картофеля разделяют на группы по устойчивости к МВК именно на основании результатов серодиагностики этого вируса. Например, сорта Гатчинский, Лорх и ряд других, у которых в 10—70 случаях из 100 до оздоровления наблюдаются положительные реакции, считаются относительно устойчивыми, а Приекульский ранний, Столовый 19, Лаймдота и многие другие, дающие 100 % положительных реакций, отнесены к числу восприимчивых. В действительности же, как показывает диагностика зараженности путем прививки зеленой ткани исследуемых образцов на томат, сорта той и другой групп практически одинаково, т. е. полностью или почти полностью, заражены вирусом М [6], но у сортов первой группы часть растений содержит инфекцию (названную нами ингибированной) без образования комплектных вирусных частиц и вирусного антигена. У таких сортов выявлено два противоположно направленных процесса: переход ингибированной инфекции в обычную и обычной в ингибиро-

ванную. Процент растений с положительной серологической реакцией определяется, по-видимому, алгебраической суммой этих двух процессов и зависит не только от степени относительной устойчивости сорта, но и от условий хранения клубней, а также условий вегетации растений в данной репродукции. Колебания температуры и ее повышение при хранении клубней, а также неблагоприятные условия вегетации, в частности, стрессовые температуры, недостаток влаги могут резко повысить этот показатель [5, 6].

Ингибированная инфекция МВК не всегда может быть обнаружена индикаторным методом (натирание листьев индикатора соком исследуемого растения). Наиболее надежна диагностика путем прививки (трансплантации) любой зеленой ткани исследуемых образцов на молодые томаты. При серийной проверке материала в практической работе может быть применен менее трудоемкий вариант этой методики: прививка отделенных листьев томата на фрагменты стебля или черешков листьев проверяемых растений с последующей инкубацией листьев в прозрачных влажных камерах на свету. Следует отметить, что слово «прививка» не вполне подходит к описанным выше приемам, так как срастания тканей здесь, как правило, не происходит и в нем нет необходимости. Больше соответствует сущности метода термин «тканевая инокуляция».

Направленная селекция сортов картофеля, устойчивых к МВК, начата сравнительно недавно. Одна из главных методических трудностей в этой работе — разграничение высокой относительной устойчивости и крайней устойчивости, наиболее желательной для селекции. Опыт, имеющийся в этой области в разных странах, указывает на то, что методы, обычно применяемые для дифференциации типов устойчивости к другим вирусам, в частности, искусственное заражение, оказываются недостаточно эффективными по отношению к МВК. При высокой относительной устойчивости испытуемого образца у него после искусственного заражения часто наблюдается отрицательный результат серодиагностики, но вирус обнаруживается в этом же образце после прививки на томат [2, 15].

По-видимому, относительная устойчивость к МВК у картофеля обусловлена действием внутренних факторов, подавляющим накопление вируса в растении и сдерживающим развитие патологического процесса.

Исходя из сказанного можно сделать следующие практические выводы для селекции и семеноводства картофеля:

— после оздоровления сорта от вирусов методом культуры меристем материал, предназначенный для ускоренного размножения, должен быть проверен на отсутствие ингибированной инфекции методом тканевой инокуляции томата. Эта проверка (отдельных растений из клонов) должна периодически повторяться и в ходе ускоренного размножения;

— при размножении оздоровленного материала зеленым черенкованием клоны должны выращиваться отдельно; в случае хотя бы одной положительной реакции при серодиагностике следует браковать целый клон;

— в селекции картофеля на устойчивость к вирусу М серологическая диагностика после искусственного заражения не может дать достаточно достоверных результатов и должна дополняться диагностикой на томатах.

### **Диагностика вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК)**

ВСЛК относится к наиболее распространенным и вредоносным вирусам картофеля. Но диагностика его разработана неудовлетвори-

тельно, что существенно затрудняет борьбу с ним в семеноводстве и селекцию устойчивых сортов. ВСЛК не передается соком, поэтому для индикаторной диагностики используют пересадку тлей или прививку. Предложенная в последние годы серологическая диагностика ВСЛК [12] пока не нашла широкого применения в семеноводстве и селекции в связи с трудностями приготовления диагностической сыворотки и спецификой самого анализа, требующего специального оборудования и реактивов. Основным и почти единственным методом выявления ВСЛК в практической работе остается визуальный. Установлено широкое распространение бессимптомной инфекции вируса на сортах картофеля [1, 9, 14]. Поэтому крайне необходимо совершенствование методов диагностики ВСЛК, в частности визуального метода определения латентной инфекции и индикаторной диагностики.

Процент растений с латентной инфекцией может быть снижен в 3—4 раза после предварительного светового проращивания клубней при 18—25° и декапитации растений [1], что дает возможность повысить эффективность визуального отбора в семеноводстве картофеля. Однако неизбежно возникает вопрос, насколько полно при этом выявляется скрытая зараженность.

Достоверность любого метода диагностики обычно сравнивают с результатами, получаемыми индикаторным методом.

Мы испытывали возможность механической передачи ВСЛК на физалис флоридский (*Physalis floridana* Rydb.) и дурман обыкновенный (*Datura stramonium* L.) с помощью специальной микрокамеры, устройство которой приведено в [4]. Рифленые штифты, проходя через диск из листа картофеля, зараженного ВСЛК, переносят фрагменты тканей непосредственно в мезофилл индикатора. В камере место инокуляции герметизируется, поэтому клетки поврежденных тканей остаются живыми не менее 20 ч. Таким путем удалось получить от 20 до 60 % заражения индикаторов. Эти результаты показывают, что механическая передача ВСЛК возможна. Дальнейшее совершенствование методики позволит добиться достаточно высокой вероятности передачи зараженности.

### **Диагностика вируса табачной мозаики (ВТМ) на томатах**

Известно, что ВТМ в культуре томата может передаваться в основном четырьмя путями: контактно-механическим, семенами, через корни (из почвы или из корней соседнего больного растения), насекомыми (в небольших масштабах). Каждому из этих путей заражения соответствует свой тип инфекционного процесса.

При контактно-механической инфекции вирус сначала распространяется в паренхиматической ткани от клетки к клетке по плазмодесмам, затем, достигнув флоэмы, быстро проникает в корневую систему, отсюда — в верхушку растения, позднее — во все надземные органы [18]. Отклонения от этого хода инфекционного процесса наблюдаются при высокой устойчивости на основе сверхчувствительности, обусловленной генами Тm-2 и Тm2<sup>2</sup>.

Общепризнано, что контактная инфекция является главным путем распространения ВТМ во время вегетации томатов, особенно в закрытом грунте. При отсутствии высокой относительной устойчивости контактно-механическая инфекция характеризуется сравнительно коротким эклипс-периодом, быстрым накоплением вируса во всех частях растения. Именно этот тип инфекции и дал повод считать диагностику ВТМ на томатах сравнительно простым делом.

Гораздо менее изучен механизм передачи ВТМ семенами и соответствующий ему тип инфекционного процесса. Вирус может находиться на поверхности семян (поверхностная контаминация), в

толще кожуры, реже — в эндосперме; случаев его обнаружения в зародыше не отмечено [10, 11]. Последнее может быть связано с тем, что вирус либо вообще не проникает в зародыш, либо проникает на ранних этапах формирования семени и затем инактивируется. Предполагается, что вирус проникает в проросток из эндосперма или с наружных покровов семени во время прорастания [16]. В проростках из зараженных семян инфекционности и антигенной активности ВТМ, как правило, не отмечается, однако присутствие вирусной инфекции может быть выявлено путем прививки проростков на турецкий табак [7]. Ингибированная инфекция этого типа может переходить в обычный патологический процесс на разных этапах вегетации — от появления проростка до плодоношения. Факторы, способствующие превращению ингибированной инфекции в обычную, доступную для серологической и индикаторной диагностики, пока не известны.

Из имеющихся данных следует, что инфекционный процесс при передаче ВТМ семенами томата резко отличается от того, который наблюдается при контактно-механической инфекции, и эти различия необходимо учитывать в практической диагностике. В настоящее время для проверки семян томата на зараженность ВТМ применяется метод, включающий серологический и индикаторный анализы экстракта измельченной пробы семян. При этом обнаруживается главным образом поверхностная контаминация семян из пульпы зараженных плодов, указывающая на наличие и внутренней инфекции. Однако эта контаминация может быть не выявлена, если семена подвергали поверхностной обработке или хранились длительное время (более года). Поэтому зараженность семян достоверно определяется только на проростках или молодых растениях, при этом методы диагностики должны обнаруживать ингибированную инфекцию.

Для того чтобы точно ответить на вопрос о зараженности партии семян ВТМ, целесообразно проводить диагностику в следующей последовательности:

— серологический и индикаторный анализы экстракта гомогенизированной пробы семян;

— проращивание пробы семян, серологический и индикаторный анализы проростков в фазе полного развития семядольных листочков;

— прививка проростков на молодые растения табака.

При положительном результате на любом этапе анализа отпадает необходимость в его продолжении. Количественный показатель (процент зараженности) в данном случае не имеет значения, так как вследствие своей высокой контагиозности ВТМ распространяется во время вегетации очень быстро, особенно в закрытом грунте.

Метод диагностики зараженности партий семян путем прививки проростков на табак вследствие его трудоемкости не применим в практике семенного контроля. Поэтому необходимы дальнейшие поиски удобных методов диагностики ингибированной инфекции ВТМ.

Значение корневой инфекции в распространении ВТМ на томате до сих пор спорно, несмотря на большое количество работ по этому вопросу. Свободный вирус сохраняется в почве очень недолго, поэтому источниками инфекции могут служить только неразложившиеся остатки больных растений, а также вирус, выделяемый в почву вегетирующими больными растениями [11, 17]. В любом случае вероятность корневой инфекции, а следовательно, и ее значение как источника первичного заражения ВТМ намного ниже, чем у семенной. Тем не менее представляет интерес сопоставление инфекционного процесса при корневом заражении с другими его типами.

По нашим данным, при заражении корней ВТМ может накапливаться в них в довольно высокой концентрации, но иногда остается локализованным в подземных органах [3]. Эта локализация может

быть истинной и ложной. В первом случае вирус не обнаруживается в надземных органах всеми методами, в том числе прививкой на табак, и из стеблевых черенков развиваются здоровые растения. Во втором случае серологический и индикаторный анализы надземных органов дают отрицательный результат, но прививка на табак и черенкование выявляют присутствие в них ингибированной инфекции. Распространение инфекции из корней может происходить в любой фазе вегетации. Отмечено, что делокализации корневой инфекции способствует повреждение надземных органов.

Следовательно, для того чтобы убедиться в полном отсутствии инфекции ВТМ в томате, необходимо проверить всеми доступными методами, кроме надземных органов, и его корни. Следует иметь в виду, что растения, содержащие ВТМ только в корнях, могут быть источниками инфекции для соседних здоровых растений.

Обзор сведений о типах инфекционного процесса ВТМ на томатах показывает, что диагностика этого вируса связана с рядом трудностей, большинство которых обусловлено существованием ингибированной инфекции. Пока не известно, что представляет собой вирус в этом состоянии: крайне низкая концентрация нормальных вирусных частиц в тканях или подавление их образования, присутствие вируса в другой форме. Возможно, что такое состояние вируса аналогично или сходно с его состоянием при так называемой сублиминальной, т. е. подпороговой (ниже порога чувствительности диагностики) инфекции ВТМ, обнаруженной в растениях, в которых этот вирус обычно не встречается, например в хлопчатнике [13].

При сопоставлении особенностей трех различных по биологическим свойствам вирусов, поражающих картофель и томаты, обращает на себя внимание один общий признак — способность находиться в растениях в состоянии, не вызывающем видимых патологических изменений, недоступном для серологической и индикаторной диагностики (МВК и ВТМ). Такая инфекция может быть обнаружена только довольно трудоемким методом тканевой инокуляции. Поэтому крайне необходим дальнейший поиск методов диагностики, удобных для широкого практического использования в селекции и семеноводстве.

Применение современных методов диагностики вирусов может быть эффективным только при условии дифференциации типов инфекционного процесса, учета особенностей каждого из них, подбора методов и методик, наиболее соответствующих состоянию вируса в исследуемом объекте.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Морозова Н. П. Некоторые приемы улучшения визуальной диагностики вируса скручивания листьев картофеля. — Изв. ТСХА, 1978, вып. 3, с. 215—219. — 2. Склярова Н. П. Некоторые вопросы селекции картофеля на устойчивость к вирусным болезням. — Обзор информ. М., ВНИИТЭИСХ, 1972. — 3. Шмыгль В. А. О корневой вирусной инфекции томатов и картофеля. — Докл. ТСХА, 1963, вып. 89, с. 393—399. — 4. Шмыгль В. А. Устройство для передачи лабильных вирусов растений. — Авт. свид. № 670278 от 23 марта 1978 г. — 5. Шмыгль В. А., Абрамова Р. Н. О некоторых биологических особенностях вируса М картофеля. — Картофель и овощи, 1970, № 7, с. 32—34. — 6. Шмыгль В. А., Русинова Е. Я., Лодочкин П. И. Диагностика вируса М картофеля. — Докл. ВАСХНИЛ,

1975, № 6, с. 13—15. — 7. Шмыгль В. А., Юнис С. И., Макаев С. Ш. Диагностика вируса табачной мозаики в семенах томата и получение здоровых семян. — Proc. of 9th Conf. of Czechoslovak Plant Virologists. Brno, 1981, p. 177—180. — 8. Bode O. — Proc. 3rd Triennial Conf. EAPR. Zürich, 1966, p. 226. — 9. Bradley R. — Can. Plant Dis. Surveyor, 1978, vol. 58, N 3, p. 56—60. — 10. Broadbent L. H. — Ann. appl. biol., 1965, vol. 56, N 2, p. 177—205. — 11. Broadbent L. H., Fletcher J. T. — Ann. appl. biol., 1966, vol. 57, N 1, p. 113—120. — 12. Casper R. — Phytopathol. Zeitschrift, 1977, Bd 90, S. 364—368. — 13. Cheo P. C. — Phytopathology, 1970, vol. 60, N 1, p. 41—46. — 14. MacKinnon J. P., Davies H. T. — Amer. Potato J., 1967, vol. 44, N 11, p. 409. — 15. Mierzwa Z., Skórko B. — Biul. Inst. Ziemi. Bonin, 1974, N 13, s. 53—64. — 16. Phatak H. — Seed Pathology: Prob-

lem and progress, 1979, p. 141—146. — 17. el G. — Ann. appl. biol., 1934, vol. 21, N 1,  
Roberts F. M. — Ann. appl. biol., 1950, p. 90—111.  
vol. 37, N 2, p. 385—396. — 18. Samu- *Статья поступила 11 июня 1982 г.*

#### Summary

The article is devoted to the problem of reliability of plant viruses diagnosis. The dependence of results of diagnosis on the type of infection process and the condition of virus in the sample studied was shown with the example of three viruses: potato M-virus, potato leaf roll virus and tobacco mosaic virus on tomatoes. Existence of inhibited viral infection was stated.