

О.Н. Будаговская  
Н.П. Сёмина  
А.В. Будаговский  
С.А. Гончаров

### ЛАЗЕРНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТОЛЕРАНТНОСТИ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ К ЛАТЕНТНОМУ ВИРУСНОМУ ЗАРАЖЕНИЮ

УДК 631.521.54:615.849.15

Для решения задач экспресс-диагностики толерантности растений яблони к вирусам разработан новый оптический метод, позволяющий выявлять структурно-функциональные нарушения в латентной стадии развития инфекции. Метод базируется на регистрации амплитудных и фазовых параметров лазерного луча (интенсивность и когерентность), рассеянного листовыми пластинками, а также динамики их изменения. Наибольшая чувствительность оценок отмечена в середине вегетации, в фазе окончательного перехода к аутотрофному типу питания.

**Ключевые слова:** Яблоня, вирусная инфекция, лазерное излучение, диагностика

Budagovskay O.N., Siomina N.P., Budagovski A.V., Goncharov S.A. **Laser method of apple treevirus infection tolerance estimation.** Novel optic method allowing detection of structure and function destruction at infection latent stage has been developed for express-diagnostics of apple tree tolerance to viruses. The method is based on laser beam amplitude and phase parameter recording (intensity and coherence) scattered by leaf and the variability dynamics. More precise measurement values were obtained in the middle period of vegetation during

**Key words:** Apple, Virus Infection, Laser irradiation, Diagnostic. the phase of final transfer to autotroph nutrition

#### Введение

Широко распространенные на плодовых возбудители вирусной этиологии, даже при латентном инфицировании, обладают большой вредоносностью – нарушают нормальный рост и развитие растений, снижают устойчивость к стресс-факторам биотической и абиотической природы и как следствие – падают продуктивность (до 60...70%) и качество урожая [3, 6]. Современные меры борьбы с вирусными и микоплазменными болезнями основаны на системе безвирусного питомниководства, строгом контроле за фитосани-

тарным состоянием растений на всех этапах размножения. Традиционные способы определения болезней по визуальным признакам надежны только на поздних стадиях патогенеза, когда трудно избежать потерь урожая. При этом не выявляется повсеместно распространенное латентное инфицирование. Более ранняя и точная диагностика возможна с использованием биотеста, электронной микроскопии, гистохимии и серологии в сочетании с полимеразной цепной реакцией, однако эти измерения невозможно проводить в полевых условиях [3, 5]. Настоящая работа посвящена исследованию возможности использования амплитудно-фазовых параметров светорассеяния лазерного луча для выявления вирусной инфекцией растений яблони в латентной стадии зараженности, а также экспресс-оценки степени её вредоносности.

#### Место проведения, объекты исследований

Исследования проводили на 4...10-летних деревьях яблони сортов Лобо, Вишнёвое и Синап Орловский на клоновых подвоях П22 и 62-396, латентно инфицированных вирусами хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), борозчатости (ASGV) и ямчатости древесины яблони (ASPV). Растения произрастали в экспериментальном саду ВНИИС, находящемся в черте г. Мичуринска. Для анализа использовали морфологически идентичные листья без внешних признаков болезни.

#### Методика исследования

Для выявления типа вирусного инфицирования применяли метод прямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием базовой методики [7].

Лазерная диагностика растений осуществлялась на специально разработанном для этих целей компьютеризированном оптическом оборудовании (Будаговская, 2007). Регистрировали когерентность  $G$ , интенсивность  $I$  и приведенную когерентность  $G/I$  прошедшего сквозь лист высококогерентного монохроматического излучения (длина волны 632,8 или 650 нм), а также относительные изменения этих показателей в процессе адаптации к интенсивному световому раздражению (динамический показатель  $Dr$ ). Каждый образец измеряли в 4...6 точках, равноудаленных от края листа и лежащих между крупными жилками.

**Принцип работы лазерного анализатора.** В основу прибора для регистрации амплитудно-фазовых характеристик светорассеяния растительной ткани положена виброустойчивая оптическая схема светосильного интерферометра сдвига. Интерферометр формирует стационарную интерференционную картину (ИК), контраст которой ( $V$ ) при соблюдении условия равенства интенсивностей интерферирующих лучей равен модулю корреляционной функции светорассеяния  $G(s)$ :

$$V = (I_{max} - I_{min}) / (I_{max} + I_{min}) = |G(s)| = \int_{-\infty}^{\infty} h(s) e^{i2\pi h/\lambda} dh, \quad (1)$$

где:  $I_{max}$  и  $I_{min}$  – максимальное и минимальное зна-

Будаговская О.Н., к.т.н.; Сёмина Н.П., к.с.-х.н.;  
Будаговский А.В., д.т.н.; Гончаров С.А. – ГНУ ВНИИ  
садоводства им. И.В. Мичурина (г. Мичуринск)

Таблица 1 – Влияние вирусной инфекции и фазы развития на когерентность светорассеяния листьев яблони

Сорт яблони	Тип инфекции	Когерентность рассеянного излучения G, %			
		май	июнь	июль	август
Вишнёвое	Контроль	37,4±0,5	11,8±0,8	10,1±0,6	7,5±0,4
	ACLSV	31,5±1,1	8,2±0,7	6,7±0,6	5,4±0,4
	ASPV	32,7±1,1	9,8±0,5	5,6±0,4	4,5±0,4
	ASPV+ASGV	35,1±1,1	6,5±0,8	6,9±0,7	5,3±0,5
Синап Орловский	Контроль	33,5±1,1	8,0±1,1	7,2±0,6	7,5±0,6
	ASPV	33,5±1,3	4,9±0,5	4,2±0,8	4,7±0,7
	ACLSV+ ASPV	34,6±1,2	7,7±0,9	5,0±0,7	5,3±0,5
	ACLSV+ASGV	34,5±0,9	5,1±0,5	5,7±0,9	8,0±0,9
Лобо	Контроль	31,4±0,9	15,2±0,8	7,0±0,5	6,5±0,5
	ACLSV	32,4±1,2	13,5±1,0	6,9±1,1	7,4±1,0
	ASPV	35,4±1,3	10,1±1,0	4,2±0,5	4,5±0,4
	ACLSV+ASPV+ASGV	32,6±1,1	10,2±0,8	5,4±0,6	3,1±0,2

чения интенсивностей ИК;  $h(s)$  и  $h$  – функция распределения и средний размер фазовых неоднородностей;  $l$  – длина волны зондирующего потока;  $s$  – разность хода интерферирующих лучей.

При взаимодействии с растительной тканью, в результате рассеяния на фазовых оптических неоднородностях (клеточные стенки, воздушные межклеточные промежутки, зерна крахмала и т.п.), лазерный луч теряет фазовую упорядоченность, и это проявляется снижением контраста ИК тем в большей степени, чем сильнее нарушена структура растительной ткани в результате функциональных перестроек или каких-либо повреждений.

Динамический показатель  $Dg$  определяется как скорость изменения приведенной когерентности светорассеяния в процессе непрерывной засветки объекта интенсивным светом (более 400 Вт/м<sup>2</sup>) и отражает способность адаптации фотосинтетического аппарата (ФСА) растений к изменяющимся условиям среды. Чем больше этот показатель ( $Dg=(dG/I)/dt$ ), тем выше диапазон адаптивных перестроек, надежность функционирования ФСА, стабильнее функциональное состояние растений [1].

### Результаты исследований

Полевая оценка влияния параметров светорассеяния листьев растений яблони, зараженных такими распространенными и вредоносными вирусами, как ямчатость древесины (ASPV), хлоротическая пятнистость листьев (ACLSV), бороздчатость деревьев (ASGV) и их комплексов, позволили выявить устойчивое снижение когерентности и приведенной когерентности прошедшего сквозь листовую пластинку лазерного луча (таблица 1). Выраженность различий зависит от возраста (фазы развития) листьев, типа вируса, климатических условий. По мере развития и старения листьев происходит изменение параметров светорассеяния, причем характер и темп этого варьирования определяется как генотипом «хозяина», так и видом вируса. В ранней фазе развития листа, когда гетеротрофный тип питания преобладает над аутоотрофным, практически нет различий средних значений амплитудно-фазовых характеристик светорассеяния контрольных и опытных вариантов. Присутствие инфекции проявляется на этом этапе только в существенном увеличении дисперсии и коэффициента вариации

когерентности (в 1,4...2,5 раза выше контроля). Наиболее выраженные изменения параметров светорассеяния (в 1,3...1,8 раза) наблюдали в середине вегетации (рисунок 1). В большинстве случаев уровень значимости нулевой гипотезы относительно контроля  $\alpha < 0,01$ . В конце вегетации различия по вариантам сглаживаются в связи с развитием деградиционных процессов старения листьев (таблица 2).

В наименьшей степени меняются показатели светорассеяния листьев при заражении вирусом хлоротической пятнистости. Для получения более достоверных различий при выявлении латентного заражения вирусом, который ослабляет функциональное состояние фотосинтезирующего аппарата, была предпринята попытка использовать динамический показатель  $Dg$  для целей диагностики.

В связи с этим оценивали оптические параметры листьев индикатора *Malus platicarpa*, при полевом тестировании на заражение вирусом ACLSV. Измерения проводили в различные сроки вегетации – во второй декаде июля (середина вегетационного сезона) и первой декаде сентября (завершение вегетационного сезона). При этом от зараженного тест-образца выбирали листовые пластинки индикатора *Malus Platicarpa* как с видимыми симптомами поражения, так и без них.

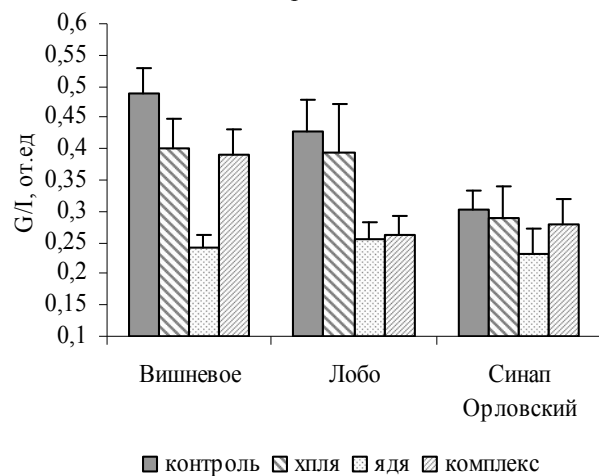


Рисунок 1 – Анализ структурно-функционального состояния контрольных и зараженных различными вирусами растений яблони на подвое P22 по критерию приведенная когерентность (G/I)

Таблица 2 – Параметры светорассеяния контрольных и зараженных вирусами растений яблони

Вариант опыта	Зрелые листья, 18.07.03		Старые листья, 21.08.03	
	G,%	G/I от.ед.	G,%	G/I, от.ед.
Вишнёвое, P22				
Контроль	12,1 ± 0,6	0,49± 0,04	7,5 ± 0,4	0,37± 0,03
Вирус*	6,7 ± 0,6	0,34± 0,04	5,0 ± 0,4	0,19± 0,02
Лобо, P22				
Контроль	7,0 ± 0,5	0,43± 0,05	6,5 ± 0,5	0,23± 0,02
Вирус*	5,5 ± 0,75	0,3± 0,05	5,1 ± 0,5	0,20± 0,02
Синап Орловский, P22				
Контроль	7,2 ± 0,6	0,30± 0,03	7,5 ± 0,6	0,33± 0,02
Вирус*	5,0 ± 0,72	0,27± 0,04	6,0 ± 0,7	0,32± 0,04
Лобо, 62-396				
Контроль	11,8 ± 0,9	0,34± 0,03	9,2 ± 0,7	0,30± 0,03
Вирус*	8,1 ± 1,2	0,31± 0,05	5,6 ± 0,5	0,24± 0,02
Синап Орловский, 62-396				
Контроль	7,2 ± 1,2	0,31± 0,05	5,7 ± 0,5	0,29± 0,03
Вирус*	5,7 ± 0,66	0,21± 0,02	5,4 ± 0,5	0,26± 0,02

\* Значения получены усреднением данных всех вариантов вирусного заражения

Контролем служили листья индикатора *Malus Platicarpa*, привитого на здоровые растения. Результаты измерений показывают незначительные различия оптических показателей листьев индикатора, привитого на зараженные растения, независимо от внешнего проявления симптомов вирусной болезни (таблица 3). В то же время, между группами зараженных и здоровых растений выявлены существенные различия, особенно по произведению показателей  $G \times Dg$ , которые сохраняются в течение всего срока вегетации. Существенно большее снижение комплексного показателя  $G \times Dg$  зараженных растений относительно здорового контроля в конце вегетационного срока соответствует общеизвестному факту, что вирусная инфекция в первую очередь способствует ускоренному старению листьев и сокращению активного вегетационного периода.

Таблица 3 – Результаты измерений оптических характеристик листьев индикатора *Malus Platicarpa* при латентном заражении ACLSV

Дата измерения, вариант	G	Dg	$G \times Dg$
<b>Вторая декада июля</b>			
Листья с симптомами	15,82 ± 0,98	0,60 ± 0,08	9,49 ± 0,28
Листья без симптомов	17,85 ± 0,54	0,61 ± 0,36	10,88 ± 0,44
Контроль	19,3 ± 0,73	0,72 ± 0,05	13,8 ± 0,19
<b>Первая декада сентября</b>			
Листья с симптомами	9,29 ± 0,21	0,57 ± 0,09	5,33 ± 0,14
Листья без симптомов	8,95 ± 0,25	0,65 ± 0,12	5,79 ± 0,17
Контроль	8,76 ± 0,33	1,043 ± 0,07	9,14 ± 0,15

### Выводы

Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что, измеряя амплитудно-фазовые параметры светорассеяния лазерного излучения, прошедшего сквозь листовую пластинку, можно выявить наличие латентной вирусной инфекции, а также оценить степень её влияния на структурно-функциональное состояние растений [4]. Это позволяет проводить сравнительную оценку реакции различных сорто-подвойных комбинаций яблони на вирусное заражение, выявить наиболее устойчивые генотипы, оптими-

зировать технологические приемы выделения и размножения безвирусных растений, осуществлять контроль качества безвирусного посадочного материала.

### Литература

- Бородин, И.Ф. Применение эффекта фотоиндуцированной изменчивости оптических свойств хлорофиллсодержащих тканей для диагностики функционального состояния растений / И.Ф. Бородин, А.В. Будаговский, О.Н. Будаговская, И.А. Будаговский, Ю.В. Судник // Доклады РАСХН. – 2008. – № 5. – С. 62-62.
- Будаговская, О.Н. Автоматизированная система контроля структурных перестроек растительных тканей / О.Н. Будаговская, А.В. Будаговский, И.А. Будаговский // Приборы и техника эксперимента. – 2007. – № 1. – С. 161-162.
- Будаговская, О.Н. Способ оценки реакции растений яблони на латентную вирусную инфекцию: Патент № 2384045, МПК<sup>7</sup> A01G 1/00 / Авторы: О.Н. Будаговская, А.В. Будаговский, Н.П. Семина, С.А. Гончаров. – Заявка № 2008115264 от 17 апреля 2008. – Зарегистрировано в госреестре изобретений РФ 20.03.2010, Бюл. № 8.
- Вердеревская, Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур / Т.Д. Вердеревская. – Кишинев: Штиинца, 1981. – 174 с.
- Фолимонова, С.Ю. Идентификация вирусов бо-роздчатости и ямчатости ствола яблони с помощью полимеразной цепной реакции / С.Ю. Фолимонова, Ю.Н. Приходько, А.А. Аграновский, И.Г. Атабеков // Доклады РАСХН. – 2000. – № 1. – С.11-13.
- Ahn, K. High plants disease of corn and wheat: Ultrastructural and serological aspects / K. Ahn, K. Kim, R. Gergerich, S. Jensen // J. Submicrosc. Cytol. And Pathol. – 1998. – V.30, № 4. – P.563-571.
- Clark, M.F. Characteristics of microplate method of enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M.F. Clark, A.N. Adams // J/Gen. Virol. – 1977. – V.34, № 3. – P. 475-483.