

DOSKONALENIE SELEKCJI POD WZGLĘDEM ODPORNOŚCI NA WIRUSY
W HODOWLI ZIEMNIAKA

Mirostawa Chrzanowska, Hanna Butkiewicz

Zakład Genetyki i Syntezy Materiałów Wyjściowych,
Instytut Ziemiaka, Oddział w Młochowie, 05-832 Rozalin

WSTĘP

Pięć lat temu uzyskano w Młochowie pierwsze materiały wyjściowe cechujące się równoczesną odpornością na kilka wirusów, a obecnie młode materiały hodowlane selekcjonuje się pod kątem kompleksowej odporności na pięć lub sześć wirusów [4]. Dobór metod selekcji uzależniony jest od rodzaju odporności, jaki na danym etapie hodowli wprowadzono do materiałów.

W odniesieniu do poszczególnych wirusów dysponujemy różnymi rodzajami odporności:

1. Do wirusów X, Y i A dysponujemy materiałami o skrajnej odporności, dziedziczonej monogenicznie i uznanej za najbardziej efektywny typ odporności.

2. Do wirusa S wykorzystujemy odporność opartą o reakcję nadwrażliwości, dziedziczoną także monogenicznie i warunkującą odporność polową ziemiaka na ten wirus.

3. Do wirusów M i liściozwoju dotychczas podwyższamy odporność względną; dziedziczenie jej nie jest zbadane.

Wysiłki nasze zmierzały do opracowania takiej metody selekcji, która pozwalałaby na możliwie szybkie i bezbłędne usuwanie form podatnych oraz właściwą ocenę odporności form odpornych na sześć wirusów. W pracy zostaną zaprezentowane metody selekcji prowadzonej w ostatnich latach w Pracowni Syntezy Ziemniaków Odpornych na Wirusy /PW/.

SELEKCJA FORM SKRAJNIE ODPORNYCH NA WIRUSY X, Y I A

Dobór metod zakażenia. Selekcję rozpoczyna się od zakażenia mechanicznego /pistoletem/ siewek w młodym wieku, począwszy od stadium liścieni. Siewki zakaża się trzykrotnie: pierwszy raz tylko wirusem Y, a następnie mieszanym inokulum X + Y. Zauważono, że w ostatnich latach trzykrotna inokulacja siewek nie była dość efektywna. Wiadomo, że efektywność zakażenia zależy jest od form rodzicielskich. W okresie, gdy partnerem dla formy skrajnie odpornej były podatne na wirus Y odmiany, odrzucenie osobników podatnych na zakażenie wirusami X i Y było łatwe i wystarczyła 2-lub 3-krotna inokulacja siewek [7, 13]. Jednakże obecnie w wielu materiałach partnerami dla formy skrajnie odpornej są klony o podwyższonej odporności na zakażenie wirusem Y, gdyż zarówno w materiałach hodowlanych, jak i własnych znajduje się wiele form wysoko odpornych na wirus Y /np. Pola, Elida, rody odporne na liściozwój/. To sprawia, że w potomstwie obok siewek skrajnie odpornych występuje dużo osobników odpornych na zakażenie. Celem podniesienia efektywności selekcji próbuje się obecnie zwiększoną liczbę zakażeń.

Wszystkie rośliny wyrosłe w próbie oczkowej zakażane są powtórnie wirusami X i Y. Rody, w których nie wykryto obecności tych dwóch wirusów, przeznaczone są do szczepienia zrazami tytoniu z wirusami X i Y. Dla stwierdzenia skrajnej odporności w danym klonie stosuje się przynajmniej dwukrotne szczepienia po kilka roślin, ponieważ zaobserwowano, że rośliny reagują niejednakowo. Wynik szczepienia sprawdza się przez testowanie roślin uzyskanych z bulw roślin szczepionych [6].

Dobór szczepów wirusów do zakażeń. Różne są poglądy dotyczące doboru szczepów wirusów do selekcji. Sarvari /inf. ustna/ stosuje mieszaninę izolatów należących do 4 różnych szczepów wirusa Y /Y^O, Y^N, Y^C, Y^{An}/. Ross [11] zaleca stosowanie szczepu Y^N, gdyż ten wywołuje nekrozy. Według badań własnych, najlepsze wyniki do tej pory daje izolat Y^O z odmiany Lipiński Wczesny, natomiast stosowane izolaty Y^N z odmian Bona i Nysa rzadziej wywołują nekrozy /np. na 50 roślin zakażonych Y^O - 47 reagowało nekrozami lokalnymi, a Y^N - tylko 27 roślin/. Jednakże według Davidsona [3], szczep Y^N porażał wszystkie badane przez niego odmiany ziemniaka, podczas gdy w stosunku do szczepu Y^O część odmian wykazywała wysoką odporność. Sprawa szczepu jest więc nadal otwarta i pożądane wydają się dalsze poszukiwania szczepu najlepszego do selekcji lub też najodpowiedniejszej mieszanki szczepów.

Spośród 42 izolatów wirusa X badanych w latach 1975-1977 wybrano izolat X₁₇ z rodu B. 5866, który poza wysoką infekcyjnością odznaczał się zdolnością do wywoływania u ziemniaka nekrotycznych i silnych objawów chorobowych [16].

Warunki infekcji i występowania objawów. Zakażenie siewek należy prowadzić w warunkach szklarniowych sprzyjających dobremu wzrostowi roślin. Próby zastosowania zacieniania roślin na 1 dobę przed zakażaniem oraz zastosowanie szoku temp. /10 lub 36°C/ przez 1 dobę

przed zakażaniem nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Traktowanie roślin przez dłuższy czas nie wchodzi w grę, gdyż siewki nie mogą ulec wybiegnięciu z uwagi na konieczność wysadzania roślin w polu w odpowiedniej kondycji. Najodpowiedniejszą okazała się temperatura 16-20°C.

Identyfikacja roślin porażonych. Pierwsza selekcja następuje na podstawie wizualnej oceny objawów chorobowych, następna na roślinach w próbie oczkowej. Usuwa się wszystkie rośliny z objawami porażenia wirusami X i Y, następnie wykonuje się test serologiczny celem wykrycia obecności wirusa X oraz test biologiczny na listkach *Solanum demissum* Y celem wykrycia wirusa Y. Po zastosowaniu szczepienia i zbadaniu zdrowotności bulw wybiera się formy skrajnie odporne na wirusy X i Y.

SELEKCJA FORM NADWRAŻLIWYCH NA WIRUS S

Dobór metod zakażenia. Selekcję rozpoczyna się od zakażenia mechanicznego /pistoletem/ siewek w młodym wieku. Gen Ns wprowadzany jest na drodze krzyżówek do form skrajnie odpornych na wirusy X, Y i A. Selekcję wykonuje się więc na te 3 wirusy na tych samych siewkach. W celu odrzucenia form podatnych zakażenie wirusem S przeprowadza się dwukrotnie po zakończeniu zakażenia wirusami X i Y. Efektywność tego zakażenia jest bardzo niska i wynosi obecnie około 20% spodziewanych ilości zakażeń. Rośliny zakażone eliminuje się na podstawie testu serologicznego, a dla definitywnego sprawdzenia obecności genu Ns stosuje się szczepienie roślin.

Dobór szczepu wirusa do zakażeń. Używa się izolatu wirusa S z odmiany Osa. Badania nad infekcyjnością wirusa S są w toku. W chwili obecnej najlepszy wydaje się izolat S 66, który okazał się

infekcyjny, szybko się namnażał i był łatwo serologicznie wykrywany w próbie oczkowej, a nawet w roślinach inokulowanych [Kowalska, inf. ustna].

Identyfikacja roślin porażonych. Wirus S namnaża się w siewkach powoli i w większości przypadków nie wywołuje żadnych widocznych objawów. Badanie porażenia roślin wykonuje się w próbie oczkowej testem serologicznym. Wybrane osobniki po selekcji na wirusy X, Y i S oraz po wstępnej selekcji na inne cechy są szczepione. Gen Ns posiadają rośliny, które po szczepieniu reagują nekrozami [6]. Stwierdzenie tej reakcji wymaga czasami kilkakrotnego szczepienia roślin danego klonu w związku z ich niejednakową reakcją.

Warunki infekcji i występowania objawów. Szczepienia wykonuje się wiosną w szklarni, gdyż zaobserwowano, że jest to najlepszy termin prowadzenia tych badań. Reakcję nekrotyczną można wykryć przez szczepienie zrazem niosącym wirus S lub szczepienie badanych roślin na pomidorze z wirusem S. Jeśli w okresie szczepienia temperatura jest niższa niż 17°C , to po 14 dniach po szczepieniu należy podwyższyć temperaturę ponad 25°C na około 2 doby. Zastosowany szok temperaturowy sprzyja ujawnieniu reakcji nekrotycznej świadczącej o nadwrażliwości. Metoda szoku temperaturowego zastosowana dla ujawniania reakcji nekrotycznej ziemniaka na wirus S została zaadaptowana przez Ostrowską na podstawie badań przeprowadzonych przez Waś /dane nie opublikowane/ dla fasoli i wirusa M.

SELEKCJA FORM WZGLĘDNIE ODPORNYCH NA WIRUS LIŚCIOZWOJU I WIRUS M

Dobór metod zakażania. Przy selekcji materiałów o kombinowanej odporności na 6 wirusów uzyskane siewki selekcjonuje się najpierw na podstawie mechanicznych zakażeń wirusami X, Y i S, gdyż jest to metoda stosunkowo łatwa i pozwalająca na szybki odrzut form podatnych.

Przy hodowli odpornościowej na wirusy liściozwoju i M metody oceny nie są tak szybkie i proste. Badanie trwa kilka lat i polega na porównaniu poziomu porażenia badanych form z poziomem porażenia odpowiednio dobranych odmian wzorcowych. Dla wirusa liściozwoju wzorcami są: odporna odmiana Apta i ród MPI-49540/2 stosowany również w Holandii i RFN, dla wirusa M wzorcami są: ród S-5592 i odmiana Certa.

Selekcja form odpornych na wirus liściozwoju. Na podstawie wieloletnich badań doszliśmy do wniosku, że selekcja w warunkach sztucznego zakażenia wirusem liściozwoju młodych roślin w szklarni jest metodą szybką i bardziej precyzyjną niż badanie w warunkach polowych. Badanie polowe traktuje się jako sprawdzian ogólnej odporności materiału [2].

Za sprawę dyskusyjną uważamy: czy należy selekcję materiałów odpornych na wirus liściozwoju prowadzić na siewkach, czy dopiero w materiale rozmnażanym z bulw? Na razie przyjęto, że zakażenie siewek może dać informację co do odporności populacji, natomiast prawidłową ocenę poszczególnych rodów można przeprowadzić dopiero na większej liczbie roślin.

Obecnie selekcję wirusem liściozwoju zaczyna się na liniach siewkowych i powtarza przez kilka lat każdorazowo biorąc do tego celu zdrowy materiał z rozmnożeń.

Dobór szczepu do zakażeń. Jako źródła wirusa liściozwoju używa się chorych roślin ziemniaka odmiany Osa. Obecnie trwają badania izolatów tego wirusa. Najnowsze obserwacje wskazują, że izolat L 18 z odmiany Irys posiada zdolność wywoływania na ziemniaku silnych objawów chorobowych [Syller, inf. ustna].

W przypadku wirusa liściozwoju stosuje się zakażenie bardzo młodych roślin, wyrastających z kiełków, mszycami /Myzus persicae/

niosącymi ten wirus. W ostatnim roku zastosowano prostszą technicznie metodę zakażenia, polegającą na nakładaniu na rośliny rosnące w skrzynkach listków rośliny źródłowej, obsadzonych mszycami i przykrywaniu całej skrzynki jednym izolatorem. Przedtem nakładano 7 mszyc na każdą roślinę i przykrywano odrębnymi izolatorami. Po 3 dniach od nałożenia listków z mszycami wykonuje się oprysk insektycydem niszczącym mszyce. Po zakończeniu tych czynności przystępuje się do zakażenia roślin wirusem M mechanicznie za pomocą pistoletu.

Identyfikacja roślin porażonych wirusem liściozwoju i trudności związane z właściwą oceną odporności. Porażenie wirusem liściozwoju stwierdza się na podstawie obserwacji objawów. Przy zakażeniu bardzo młodych roślin w warunkach szklarniowych objawy występują już po 2-4 tygodniach i są na tyle wyraźne, że przybierają charakter objawów wtórnych. Jednakże opieranie oceny na objawach zewnętrznych jest niewystarczające, ponieważ objawy ulegają dużej zmienności zależnie od warunków, genotypu, szczepu wirusa itp. Mogą być również formy, które nawet przy wczesnym zakażeniu ujawniają objawy dopiero w potomstwie wegetatywnym otrzymanym z bulw. Biorąc to pod uwagę, uważamy za konieczne powtarzanie badań i kontrolę porażenia roślin wyrosłych z bulw. Duże utrudnienie stanowi brak dokładnych i mało pracochłonnych metod diagnostycznych wirusa liściozwoju. Przeprowadzono w ostatnich latach sprawdzenie przydatności testu kalozowego do masowych badań materiału hodowlanego. Stwierdzono, że testem kalozowym wykrywa się mniej roślin niż wskazują na to objawy chorobowe porażenia wirusem liściozwoju. Dodatkowo testy kalozowe, w większości przypadków są zgodne z obecnością objawów na roślinach. W przeprowadzonych badaniach:

- testy na bulwach są zgodne w 84-87%,

- na ogonkach liściowych 54-61%,
- na wierzchołkach pędów 34-73% [Butkiewicz, dane nie opublikowane]. Pewne nadzieje zwiększenia wykrywalności roślin porażonych wirusem liściozwoju pokładamy w teście ELISA.

Selekcja form odpornych na wirus M. Dobór szczepu wirusa do zakażeń. Jako źródło wirusa M używa się izolatu z odmiany Uran. Obecnie najlepszy jest izolat M 55, który wywołuje wyraźne objawy chorobowe, stosunkowo szybko się namnaża i jest łatwo wykrywany serologicznie [7].

Identyfikacja roślin porażonych. Ocena porażenia roślin wirusem M rozpoczyna się po 4-6 tygodniach od zakażenia. Ponieważ objawy wywoływane przez wirus M rzadko są obserwowane w roku zakażenia - zdrowotność roślin ocenia się głównie w próbie oczkowej na podstawie testu serologicznego. Ocena względnej odporności na wirus M musi być powtarzana z uwagi na dużą zależność od czynników zewnętrznych.

WSPÓLDZIAŁANIE MIĘDZY WIRUSAMI

Przy zakażeniu roślin kilkoma wirusami występują współdziałania, które utrudniają ocenę materiału. Z badań A.F.Rossa [10] wynika, że obecność wirusa X w inokulum powoduje zmniejszenie zakażenia roślin wirusem Y oraz osłabienie objawów chorobowych. Wiadomo też, że wirusem X łatwiej zakazić rośliny niż wirusem Y. Dlatego przyjęto w Młochowie następującą kolejność zakażenia: najpierw wirusem Y, a następnie X + Y. Kolejność tę stosuje się również w Starym Oleśnie [1].

Z badań Pietrak [9] wynika, że wirus S wywiera ograniczające działanie na wirusy X i Y. Próby zakażenia siewek w różnej kolejności wykazały, że najlepsze wyniki uzyskano, gdy wirus S wprowadzano po zakażeniu roślin wirusem Y.

Przy zakażaniu roślin wirusami M i liściozwoju najpierw stosuje się zakażanie roślin wirusem liściozwoju, a następnie wirusem M, wobec którego odporność związana z wiekiem roślin wzrasta powoli [15]. Współdziałanie wirusów M i liściozwoju odgrywa mniejszą rolę, gdyż ocenia się negatywnie zarówno rody porażone w dużym procencie przez wirus liściozwoju, jak i przez wirus M i ocenę powtarza się kilkakrotnie.

Stosowane przez nas metody selekcji są ciągle udoskonalane. Obecnie stoją przed nami problemy selekcji w materiałach 24-chromosomowych, gdzie wprowadzany jest znacznie wyższy poziom odporności na wirus M z *Solanum gourlayi* [5, 12, 14]. Wymaga to udoskonalania metod zakażania wirusem M i wykrywania tego wirusa /wobec niskich jego koncentracji/ oraz połączenia metod selekcji na inne wirusy na jakościowo nowym materiale hodowlanym. Bardzo pożądane jest również opracowanie lepszego testu do wykrywania wirusa liściozwoju. W związku z programem homozygotyzacji spodziewamy się redukcji liczby uwzględnianych przy selekcji wirusów /np. Y, X/, lecz na pewno przez dłuższy jeszcze czas będzie potrzebne szybkie wyróżnianie form najodporniejszych na liściozwoj.

LITERATURA

1. Belina Z., Pochitonow Z., Zdański J.: Hodowla ziemniaka w ZDZ Stare Olesno, Zesz. probl. Post. Nauk rol., 191, 213-219, 1977.
2. Butkiewicz H.: Sztuczne zakażanie wirusem liściozwoju ziemniaka jako metoda selekcji rodów ziemniaka odpornych na ten wirus, Biul. Inst. Ziemn., /w druku/.
3. Davidson T.M.W.: The grouping of some strains of virus Y in relation to resistant cultivars, 7th Trienn. Conf. EAPR, Warsaw, Abstr., 161, 1978.

4. Dziewońska M., Butkiewicz H., Czech B., Ostrowska K.: Postępy syntezy ziemniaków odpornych na wirusy, Zesz. probl. Post. Nauk rol., 191, 63-70, 1977.
5. Dziewońska M., Ostrowska K.: Resistance to potato virus M in certain wild potato species, Potato Res., 21, 129-131, 1978.
6. Dziewońska M.A., Pochitonow Z.: Synteza ziemniaków odpornych na wirusy, Zesz. probl. Post. Nauk rol., 118, 97-118, 1971.
7. Dziewońska M., Pochitonow Z., Butkiewicz H., Haze G.: Badania prowadzone w Pracowni Hodowli Odpornościowej na Wirusy, Biul. IHAR, 5-6, 53-56, 1965.
8. Kowalska A.: Differences among isolates of potato virus M and potato virus S, Phytopathol. Z., 93, 227-240, 1978.
9. Pietrak J.: Wpływ wirusa S względnie wirusa M na wynik zakażenia wirusami X lub Y ziemniaka przy równoczesnym zakażeniu roślin, Ziemniak, 13-31, 1980.
10. Ross A.F.: Local lesion formation and virus production following simultaneous inoculation with potato virus X and Y, Phytopathology, 40, 24, Abstr., 1950.
11. Ross H.: Methods for breeding virus resistant potatoes, Rep. Planning Conf. Develop. in the Control of Potato Virus Dis., Lima, Peru, 93-144, 1977.
12. Świeżyński K.M., Dziewońska M.A., Ostrowska K.: Inheritance of the resistance to potato virus M found in *Solanum gourlayi* Haw., Genetica Polonica, 22, 1-8, 1981.
13. Świeżyński K.M., Sieczka M.T.: Breeding of parental lines of potato with extreme resistance to viruses X and Y, Genetica Polonica, 12, 77-85, 1971.
14. Waś M., Dziewońska M., Ostrowska K., Kowalska A.: Reaction of *Solanum gourlayi* and its hybrids with *S. tuberosum* to potato virus M /PVM/, Phytopathol. Z., 97, 2, 186-191, 1980.
15. Wisłocka M.: M-Virusbefall von 3 Kartoffelsorten in Abhängigkeit vom Inokulationstermin der Pflanzen und der Knollenernte unter Feldbedingungen, Potato Res., 20, 163-172, 1977.
16. Zagórska H., Chrzanowska M.: Dobór szczepów wirusa X do selekcji siewek ziemniaka w hodowli odpornościowej, Biul. Inst. Ziemn., 23, 15-23, 1979.

Мирослава Хшановска, Ганна Буткевич

УЛУЧШЕНИЕ ОТБОРА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ВИРУСАМ В СЕЛЕКЦИИ
КАРТОФЕЛЯ

Р е з ю м е

Рассматриваются некоторые аспекты отбора форм картофеля с комплексной устойчивостью к вирусам X, Y, A, S и M, а также к вирусу скручивания листьев.

1. Отбор форм крайне устойчивых к вирусам X, Y и A. Троекратно повторяемая инокуляция молодых сеянцев: первый раз — только вирусом Y, а затем смешанным инокулятом X + Y, оказалась менее эффективной, чем прежде. Предполагается, что эффективность отбора связана с использованием для скрещивания родительских форм более устойчивых к заражению вирусом Y. Испытуется увеличение числа поражений.

Для подтверждения появления крайней устойчивости к вирусам X и Y в клонах, прививается по несколько растений из клона, так как наблюдалась изменчивость реагирования индивидуальных растений на заражение. Для инокуляции применяются следующие (вирулентные и патогенные) штаммы: y^0 из сорта Липиньски Вчесны и X I7 из рода В.5866. Высокий процент заражений и отчетливые симптомы получают, когда растения выращивают в теплице в температуре 16-20°C.

2. Отбор сверхчувствительных форм к вирусу S. Применяется механическая инокуляция сеянцев, хотя её эффективность низкая. Растения из клонов свободных от вируса прививают несколько раз на помидор зараженный вирусом S. Для заражений используется изолят вируса из сорта Оса. Повышение температуры до 25°C в течение двух суток в период 14 дней от прививки растений вызывает появление более сильных симптомов некрозов типичных для растений с геном Ns.

3. Отбор относительно устойчивых форм к вирусу скручивания листьев и к вирусу M. Применяется заражение по несколько растений из клона в течение нескольких лет и оценивается поражение по отношению к устойчивым образцам. В первый раз заражают

вегетативное потомство сеянцев. Для заражения используют изолят вируса М из сорта Уран и изолят вируса скручивания листьев из сорта Оса. Исследования проводятся в теплице. Вирусом скручивания листьев заражают ростки, пользуясь как переносчиком тлей *Myzus persicae*, а вирусом М заражают растения картофеля механически.

Взаимодействие вирусов при отборе материалов с комплексной устойчивостью привело к необходимости определения очередности заражений отдельными вирусами. Сначала сеянцы заражают вирусом У, затем X + У и дальше вирусом S. Клоны заражают впервые вирусом скручивания листьев, а затем вирусом М. Прививки проводятся каждым вирусом в отдельности.

Для обнаружения вирусов проводят наблюдения за болезненными симптомами, серологические тесты (М, S и X), биологический тест для *Solanum demissum* У и метод Игель Ланге (вирус скручивания листьев). Клубни растений, которые не проявили поражений подвергаются исследованию глазковым методом.

Mirosława Chrzanowska, Hanna Butkiewicz

IMPROVEMENT IN THE SCREENING FOR VIRUS RESISTANCE IN POTATO BREEDING

S u m m a r y

Some aspects of screening potato clones for resistance to potato viruses X, Y, A, S, M and leafroll are described.

1. Selection of clones extremely resistant to PVY, PVX and PVA. Three times repeated mechanical inoculation of young first year seedlings: at first with PVY and then with PVX + PVY is less effective than formerly. Probably the less effective selection is connected with the high level of resistance to PVY of parental lines. At present increasing of the number of inoculations is tested.

To confirm the extreme resistance to PVY and PVX in potato clones, grafting of several plants is necessary because of the variability in the reaction of individual plants to infection. For inoculation are used following virulent and pathogenic strains: PVY⁰ from potato cv. Lipiński Wczesny and PVX 17 from the clone B.5866. A high percentage of infections and severe symptoms are obtained when plants are grown in a greenhouse at a temperature of 16-20°C.

2. Selection of clones hypersensitive to PVS. Mechanical inoculation of first year seedlings is applied although its efficiency is low. Plants of virus free clones are grafted on PVS infected tomatoes /several plants are grafted from each clone/. As a source of the virus an isolate from cv. Osa is used. If, 14 days after grafting, the temperature is increase above 25°C for 2 days, necrotic symptoms typical for plants with the Ns gene are better expressed.

3. Selection of clones with relative resistance to PLRV and to PVM. Several plants of each of the evaluated potato clones and of cultivars used as standards are inoculated with these viruses. The first inoculation is done on the first tuber progeny. For inoculation are used: the PLRV isolate from cv. Osa and the PVM isolate from cv. Uran. Sprouts of investigated potato plants are inoculated with aphids *Myzus persicae* carrying PLRV and small potato plants are inoculated with PVM by spray-gun in the greenhouse conditions.

The character of interactions between viruses in potato plants determines the order of inoculations. First year seedlings are first inoculated with PVY, then with PVY + PVX and next with PVS. The tuber progeny is first inoculated with PLRV and then with PVM. The plants are grafted with PVY, PVX and PVS separately.

For the detection of the viruses we used visual observations, serological tests /PVM, PVS, PVX/, biological test on *Solanum demissum* Y /PVY/ and eventually Igel-Lange test /PLRV/. Tubers of inoculated plants in which the virus was not found are tested by tuber indexing.