

УДК 576.S58.8:631.524.86:632.938

МЕТОДИКА ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ ИСХОДНОГО И СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА КАРТОФЕЛЯ К М-ВИРУСУ

В. А. ШМЫГЛЯ, О. И. НИКОЛАЕВА, Э. В. КИРСАНОВА

(Кафедра фитопатологии)

Приведены результаты оценки устойчивости нескольких комбинаций межвидовых гибридов картофеля к М-вирусу (*potato virus M.*), проведенной с применением капельной серодиагностики и иммуноферментного анализа. Предложена методика определения устойчивости, включающая искусственную инокуляцию, предварительный отбор по результатам капельной серодиагностики, иммуноферментный анализ и статистическую обработку его результатов в сравнении с устойчивым эталоном. Эта методика позволяет получить количественную характеристику устойчивости образцов в течение одной вегетации.

М-вирус картофеля (МВК) *potato virus M.* (PVM) широко распространен во всех районах промышленного картофелеводства нашей страны. Снижение урожая при заражении этим вирусом достигает 40 %. А если учесть, что многие возделываемые сорта заражены им полностью, то по суммарному ущербу МВК, по-видимому, занимает одно из первых мест среди мозаичных вирусов картофеля. Использование в первичном семеноводстве оздоровленного от вирусов исходного материала не снимает проблемы. МВК появляется в этом материале, как правило, первым и зараженность им растет быстрее, чем другими вирусами. Сортов, в достаточной мере устойчивых к данному вирусу, нет. Отмеченные в литературе [6, 7] различия сортов по относительной устойчивости к МВК очень нестабильны, зависят от условий выращивания, штаммового состава вируса.

Селекция картофеля на устойчивость к МВК существенно отстает от требований практики. Среди причин отставания — большие затраты труда и времени на диагностику, слабая изученность биологии вируса, узкий диапазон доноров устойчивости и необходимость их длительного беккроссирования.

Вирус длительное время может находиться в растениях в состоянии, недоступном для капельной серодиагностики [1, 2]. В связи с этим весьма актуален вопрос о методах диагностики МВК, пригодных для массовых анализов при определении устойчивости к нему исходного и селекционного материала.

Достаточно высокая устойчивость к МВК обнаружена у некоторых форм диких видов *S. megistacrolobum* [4] и *S. gourlayi* [5]. Относительно типов устойчивости у этих форм нет единого мнения. Предполагается, что у *S. megistacrolobum* она выражается в неполной сверхчувствительности в сочетании с торможением транспорта и накопления вируса, а у *S. gourlayi* — в торможении транспорта и накопления вируса. Форм с крайней устойчивостью пока не найдено, однако их существование не исключается. Использование устойчивых форм усложняется не только полигенным характером наследования устойчивости, но и тем, что у них преобладают дикие признаки, поэтому требуются многократное беккроссирование с культурными сортами и отбор устойчивых генотипов в каждой популяции.

Эффективность селекции на устойчивость во многом определяет методика отбора устойчивых образцов и разделения их по типам устойчивости.

В нашей работе были поставлены следующие задачи: сравнить эффективность и достоверность капельного серологического метода (КСМ) и иммуноферментного анализа (ИФА) в диагностике зараженности и устойчивости межвидовых гибридов картофеля к МВК; найти оптимальное сочетание методов диагностики для дифференциации типов устойчивости к МВК; изучить возможность количественной оценки относительной устойчивости к МВК с помощью ИФА.

Методика

В качестве подопытного материала использовали образцы беккроссов четвертого поколения *S. megistacrolobum* (B_4 mга) и гибриды первого поколения между *S. gourlayi* и *S. tuberosum* (F_1 grl×tbr).¹

Образцы выращивали клонами в теплице в открытом грунте. По 2—4 растения каждого образца (клона) инокулировали МВК механическим способом в молодом возрасте (при высоте около 15 см). Для инокуляции использовали сок растений томаты сорта Невский, зараженных изолятом

МВК с картофеля сорта Домодедовский. Инокулированные и контрольные растения каждого образца анализировали на зараженность МВК с помощью КСМ и ИФА через 30 и 60 дней после инокуляции. Для ИФА применяли диагностические препараты, приготовленные в НИИ картофельного хозяйства Агропрома РСФСР. Количественные результаты ИФА (показатель оптической абсорбции) получали с помощью автоматического ридера Dynatech MR-600 при длине волны 490 нм.

Результаты

На первом этапе работы (1979—1982 гг.) для обнаружения МВК применяли главным образом КСМ. В год инокуляции (1979 г.) положительные результаты КСМ показали 55 образцов (36 %) B_4 mга и 20 образцов (41,6%) F_1 grl×tbr. Все образцы продолжали репродуцировать и ежегодно подвергали двукратному анализу на зараженность МВК. По результатам анализов в трех последовательных репродукциях все образцы разделили на 6 групп, которые можно обозначить следующим образом: 1 + + +; 2 ++—; 3 +—; 4 — ++; 5 — — +; 6 — — —. Очевидно, что интерес для дальнейшей работы может представлять только группа 6.

Однако такой метод отбора устойчивых форм неприемлем для практики, во-первых, из-за больших затрат времени и труда, во-вторых, потому, что при этом не исключается вероятность обнаружения вируса в следующей, четвертой репродукции. Так как КСМ не обеспечивает достаточной эффективности и достоверности отбора устойчивых форм, этот метод можно применять только для предварительной браковки неустойчивых образцов с целью уменьшения объема последующих анализов другими методами.

На втором этапе работы (1983—1986 гг.) использовали как КСМ, так и ИФА. При этом, кроме сравнения достоверности данных методов, ставилась задача получить количественные результаты ИФА с целью их использования для определения относительной устойчивости к МВК.

Предположение о возможности количественной оценки устойчивости с помощью ИФА основывается на следующих соображениях. Известно, что основными показателями количественной (относительной) устойчивости к вирусам являются продолжительность инкубационного периода, вероятность заражения, вероятность проявления симптомов и степень их выраженности, скорость распространения и накопления вируса в растении [3]. Из этого перечня наибольшее значение применительно к МВК на картофеле имеет скорость распространения и накопления вируса в растении после искусственной инокуляции. Данный показатель поддается количественному учету путем определения концентрации вируса в соке через определенное время после инфицирования. В частности, ИФА в сочетании с фотометрическим определением результатов (коэффициента оптической абсорбции A_{490}) дает возможность количест-

¹ Первые образцы представлены проф. Х. Россом из Института Макса Планка (ФРГ), вторые — от Н. А. Житловой из ВНИИ растениеводства им. Н. И. Вавилова.

венно оценить концентрацию вируса в сравнении с эталоном, т. е. образцом с известным его содержанием. Исходя из этого мы предположили, что ИФА серии образцов, показавших после искусственного заражения отрицательные результаты КСМ, позволит разделить их на группы по значениям A_{490} , отражающим концентрацию вируса в соке, а следовательно, и уровень относительной устойчивости к МВК.

Однако здесь возникают вопросы, насколько достоверны числовые значения A_{490} и каков диапазон случайных колебаний данных значений при анализе нескольких растений одного образца и нескольких проб сока одного растения. С целью выяснения этих вопросов одну пробу сока анализировали в 4 лунках палеты, от одного растения брали по 4 пробы сока и по одной пробе сока брали от 4 растений одного клона. Во всех трех вариантах случайные, т. е. вызванные неконтролируемыми факторами, отклонения от средней могут достигать $\pm 50\%$. Их причины можно назвать лишь предположительно: неизбежные погрешности при дозировке реактивов при анализе, неоднородность материала палеты, неравномерность концентрации вируса в разных частях растений, индивидуальные особенности каждого растения. Анализ 4 растений каждого образца (по 4 лунки от каждого растения) дает возможность в значи-

Т а б л и ц а 1

Распределение межвидовых гибридов *Solarium* (%) по результатам ИФА после искусственного заражения

Материал	Количество образцов	Образцы со значениями A_{490} о. ед.				КСМ. %
		ниже 0,2	0,2—0,4	0,4—0,6	выше 0,6	
V_4 mga	152	26,3	10,5	12,5	50,7	50,7
F_1 grl×tbr	48	20,8	14,6	18,8	45,8	45,8

тельной степени нейтрализовать действие случайных факторов, однако оценочным показателем должно служить не среднее, а максимальное для данного образца значение A_{490} , показывающее возможный уровень репродукции вируса в образце.

В табл. 1 приведено распределение образцов по максимальным значениям A_{490} . Как видно из табл. 1, образцы неравномерно распределяются по группам с интервалом 0,2 оптических единиц (о. ед.). Все образцы, показавшие результаты ИФА выше 0,6 о. ед., дали положительные результаты КСМ. Очевидно, что все образцы со значениями A_{490} выше 0,4 о. ед. должны быть оценены как неустойчивые. Они составляют 63,2 % у V_4 mga и 54,6 % у F_1 grl×tbr. По-видимому, граница между высокоустойчивыми и условно устойчивыми образцами находится в группе до 0,2 ед. Чтобы найти эту границу, следует определить наименьшую существенную разницу ($HCP_{05}-t_{05} \cdot Sd$) со средним значением A_{490} в данной группе. Все образцы, у которых значения A_{490} существенно меньше средней, включаются в 1-ю группу. Это образцы с высокой относительной устойчивостью, накопление вируса у них не выявляется с помощью ИФА. В исследованных двух комбинациях беккроссов V_4 mga обнаружено 5 таких образцов (3,3 %) и в материале F_1 grlxtbr — 2 (4,2 %).

В результате весь исследованный материал по устойчивости к МВК распределяется на 3 группы (табл. 2). Образцы 1-й группы используются в создании исходного материала в отделе селекции Научно-исследовательского института картофельного хозяйства Агропрома РСФСР. Повторная инокуляция подтвердила их высокую устойчивость к МВК.

Описанный процесс оценки устойчивости от искусственной инокуляции до выделения форм с высокой устойчивостью для дальнейшей работы может быть проведен в течение одной репродукции при сочетании капельной серодиагностики (предварительная браковка) и иммуноферментного анализа (получение количественных результатов).

Распределение образцов межвидовых гибридов по уровню относительной устойчивости к МВК

Материал	Количество образцов	В т. ч.:		
		высокоустойчивые	среднеустойчивые	неустойчивые
B_4 mga	152	5 (3,3)	51 (33,5)	96 (63,2)
F_x grl×tbr	48	2 (4,2)	15 (31,2)	31 (64,6)

Примечание. В скобках — %.

На основании результатов проведенных исследований может быть рекомендована следующая схема оценки устойчивости исходных и селекционных образцов в МВК.

1. Искусственное заражение молодых (в возрасте около 20 дней после всходов) одностебельных растений, не менее 4 на каждый образец, в защищенном грунте.

2. Визуальная браковка через 45 дней после инокуляции и диагностика зараженности МВК капельным серологическим методом, выбраковка образцов с положительным результатом анализа хотя бы у одного растения.

3. Иммуоферментный анализ оставшихся образцов, по 3 лунки палеты на каждые 4 растения образца. Номера образцов располагают в порядке возрастания максимальных значений A_{490} и разбивают на классы с интервалом $I = \frac{A_{490}^{макс}}{3}$, округленным до первого десятичного знака.

4. В классе с наименьшими значениями A_{490} находят образцы, у которых значения A_{490} достоверно меньше средней для данного класса. Это наиболее устойчивые образцы (1-я группа). Остальные образцы этого класса относят к среднеустойчивым (2-я группа).

5. Образцы 1-й группы испытывают на крайнюю устойчивость к МВК методом прививки.

Местная некротическая реакция на инокуляцию МВК встречалась у образцов B_4 mga, позднее отнесенных к разным группам по устойчивости. Следовательно, сверхчувствительность не определяет устойчивость у этих форм, а относительная устойчивость основана преимущественно на торможении распространения и накопления вируса в растениях. Интересно отметить, что это торможение может наблюдаться не только в год инокуляции, но и в следующей клубневой репродукции.

Отмечено также, что процент положительных результатов всех методов диагностики МВК в одних и тех же образцах, как правило, выше на открытом участке, чем в защищенном грунте (под стеклом и пленкой). Поэтому рекомендуется начинать испытание устойчивости ранней весной в теплице, а летом выставлять образцы на открытую площадку, где и завершать их оценку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нурмисте Б. Х. О серологической определяемости вирусных инфекций у картофеля. — Тез. докл. науч. конф. прибалтийских республик по защите растений. Тарту, 1968, с. 50—51. — 2. Шмыгля В. А., Абрамова Р. Н. О некоторых биологических особенностях вируса М. Картофель и овощи, 1970, № 7, с. 32—34. — 3. Кеглер Н., Кеглер У. — Arch. Phytopathologie und Pflanzenschutz. Berlin, 1987, Bd. 23, N 5, S 343—348. — 4. Росс Н. Kartoffel (S. tuberosum L.) Zflchtung landwirtschafth. Kulturpflanzen. Bd. 2. — Berlin—Hamburg, 1970. — 5. Was M., Dziewonska K., Ostrowska K., Kowalska A. — Phytopathol. Z., 1980, vol. 97, N 2, p. 186—191. — 6. Weidemann H. L. Verbreitung von Kartoffel-M-Virus (PVM) im Kartoffelortiment. Jahresbericht Biol. Bundesanstalt fflr Land- und Forstwirtschaft. — Berlin—Braunschweig. — 1979, H. 62. — 7. Zadina J. — Rostlinna vyroba, 1970, vol. 16, N 7, S. 721—726.

Статья поступила 28 февраля 1988 г.

SUMMARY

The commonly used technique for determining potato field resistance to M-virus (PVM) requires much labour and time (2—3 years). The results of assessing the resistance in some Solanum genus hybrid combinations are described. A new technique including mechanical inoculation, preliminary selection after drop agglutination test, ELISA — test with statistical analysis of its quantitative results is suggested. The technique allows to determine relative resistance during one vegetation.