Inaktywowanie wirusa mozaiki tytoniu w nasionach pomidorów

Inactivation of tobacco mosaic virus in tomato seed

KRZYSZTOF NIEMYSKI

Wirus mozaiki tytoniu (WMT), występujący na plantacjach pomidorów, jest jednym z czynników istotnie obniżających ilość i jakość plonu.

Obecność WMT u pomidorów była wielokrotnie stwierdzana tak na plantacjach polowych, jak w szklarniach i na plantacjach nasiennych; w wielu przypadkach do 100 % roślin bywa nim zarażonych [12, 20, 22]. WMT bywa przy tym często jednym ze składników kompleksu wirusowego, zazwyczaj w kombinacji z wirusami X i Y ziemniaka oraz wirusem mozaiki ogórka [19, 26].

Straty powodowane WMT bywają duże, trudno jest jednak określić ich przeciętną wielkość; zależnie bowiem od warunków wzrostu, odmiany pomidorów i szczepu wirusa oraz pory zarażenia — ulegają one znacznym wahaniom; szacuje się je na 0—80 % plonu [12, 26]. Niekorzystnie zmienia się także skład chemiczny owoców; stwierdzano obniżenie zawartości kwasu askorbinowego o 40—50 %, obniża się też zawartość cukrów i suchej masy; u niektórych odmian, zarażenie WMT (szczególnie późna infekcja), bywa przyczyną wewnętrznej brązowej plamistości owoców [3, 9, 21].

Przeciwdziałanie rozprzestrzenianiu się zarażeń wirusowych ma zatem istotne znaczenie gospodarcze. Za jeden z elementów akcji sanitarnej uważać należy wysiew nasion pochodzących z plantacji nie zawirusowanych, lub też takich nasion, w których wirus został inaktywowany. Liczyć się bowiem należy z możliwością przekazywania WMT za pośrednictwem nasion.

Sprawa przekazywania WMT przez nasiona nie została do tej pory w pełni wyjaśniona. Natomiast występowanie WMT w nasionach pomidorów, pochodzących z zakażonych roślin, uważać można za udowodnione [2, 4, 11, 25]. WMT znajdowany był w zarodku, obecnie jednak obserwacje Berkeley'a, który w 1932 roku donosił o takim przypadku, uważa się za błędną [7, 6, 25]. Chamberlain sądził, że WMT bywa jedynie zewnętrznym zanieczyszczeniem okryw nasiennych, jednak Crowley, a ostatnio Taylor, znaleźli wirus mozaiki również wewnątrz okrywy, a nawet wg Taylora, występuje on w pewnej niewielkiej ilości w endospermie [5, 25].

Nasiona roślin zawirusowanych odznaczają się największą zawartością wirusa bezpośrednio po zbiorze owoców; w miarę przechowywania nasion, jak to stwierdził Doolittle, wirus ulega stopniowo inaktywacji [11]. Według Johna i Nitzany'ego, w pewnych, jeszcze niedostatecznie ściśle określonych warunkach, zawirusowanie nasion utrzymuje się przez czas dłuższy [16, 22].

Nie ma natomiast zgodności poglądów co do częstotliwości przedstawiania się wirusa z nasion na młode siewki. Niektórzy badacze wysiewając zakażone nasiona otrzymali znaczne ilości zawirusowanych roślin [4, 11], inni natomiast chorych roślin nie znajdowali [1, 17, 22]. Obserwacje Beweleya, Goldina, Alexandra, oraz ostatnie wyniki badań Taylora i współpracowników, świadczą jednak raczej o możliwości zarażania siewek [8, 1, 12, 25]. Badania Milbratha wykazują również, że istnieć mogą znaczne różnice odmianowe [18].

Dla inaktywacji WMT w nasionach pomidorów proponowano szereg metod: 1) otrzymywania nasion z pulpy owocowej z zastosowaniem jej fermentacji, 2) po zakwaszeniu pulpy kwasem solnym [24, 4, 22] i 3) obróbkę nasion przechowywanych środkami chemicznymi takimi, jak HCl, NaOH, KMnO_4 , Na_2PO_4 , a także auksynami, 2,4-D, formaliną, sublimatem, kwasem pikrynowym [10, 12, 19, 13, 14, 15, 22]. Stosowano również ultradźwięki oraz inaktywację termiczną [13, 15]. Niektóre z polecanych metod (wg badaczy, którzy je polecali), dawały zadowalające wyniki, brak jest jednak danych o osiągnięciu pełnej inaktywacji wirusa, a w niektórych badaniach stwierdzano niedostateczną inaktywację. Nitzany stosując fermentację owoców otrzymywał nawet nasiona silniej zawirusowane niż przy mechanicznym wypłukiwaniu nasion z rozdrobnionego miąższu [22], Howles donosi o niedostatecznej skuteczności inaktywowania wirusa w czasie ekstrakcji kwasowej [14]. Według Goldina, złe wyniki otrzymywano również przy traktowaniu nasion formaliną i sublimatem [12], a według Howlesa, nie dało pozytywnych efektów zastosowanie auksyn i 2,4-D, jak też i ultradźwięków, a inaktywacja termiczna miała tylko częściowo pozytywny skutek [13, 15].

Ze względu na sprzeczne opinie i niedostateczne wiadomości o przekazywaniu WMT za pośrednictwem nasion, w przedstawionych niżej badaniach sprawdzono: a) jak częste jest występowanie WMT wśród nasion znajdujących się w sprzedaży, b) jak częste jest ono w warunkach uprawowych zbliżonych do normalnych (w szklarni) oraz c) jaka jest skuteczność polecanych metod inaktywacji WMT w nasionach.

MATERIAL I METODY

Posługiwano się następującymi nasionami:

1. Dla badania skuteczności inaktywacji WMT w czasie ekstrakcji nasion z resztek owoców użyto nasion pomidorów odmiany Mory 33. Rośliny macierzyste zarażano wirusem w okresie poprzedzającym kwitnienie; nasiona wybie-

rano z owoców w pełni dojrzałych, stosując trzy metody ekstrakcji: a) mechaniczną, b) fermentacyjną i c) kwasową. Nasiona tej samej odmiany używano do badań tempa inaktywacji wirusa w czasie kiełkowania oraz przekazywania wirusa z nasion na siewki.

2. Dla stwierdzenia występowania WMT w nasionach, znajdujących się w handlu, przebadano próbki nasion zakupionych w sklepach Spółdzielni Ogrodniczej w Łodzi, oraz nasiona otrzymane za pośrednictwem Związku Ogrodników w Łodzi. Nasiona pochodziły ze zbiorów w latach 1960 i 1961.

Ekstrakcje nasion przeprowadzono następująco:

- metoda mechaniczna — po rozdrobnieniu owoców (rozcierano je na sitku), płukano wodą do usunięcia resztek miąższu i suszono na bibule w cieniu.
- Metoda fermentacyjna — rozdrobnione owoce pozostawiano przez 3 dni w temperaturze 20 °C i 35 °C, następnie przemywano wodą i suszono jak wyżej.
- Metoda kwasowa — do rozdrobnionych owoców dolewano stężonego kwasu solnego (ciężar właściwy 1,4) w stosunku 100 ml na 5 kg miąższu, mieszano, pozostawiono na 2 godz., po czym przemywano wodą i suszono; temperatura płynu 20 °C i 35 °C.

Suche nasiona moczoło przez 6 godzin w wodzie, po czym przez 15 minut w następujących odczynnikach: HCl 1%, NaOH 2%, KMnO_4 1%, Na_3PO_4 10% — przy temperaturach 20 °C i 35 °C. Środek zmniejszający napięcie powierzchniowe: „Netzmittel-Wolfen” stosowano w stężeniu 1%, ultradźwięki przy natężeniu pola 4 W/cm² i 800 kHz, temperatura 20 °C i czas nadźwiękowania 15 minut.

Po wszystkich zabiegach nasiona przemywano w wodzie bieżącej i suszono na bibule w temperaturze pokojowej, w cieniu.

WMT wykrywano przez inokulacje połówek liściowych *Nicotiana glutinosa* L. Liście były opylane karborundum, zwilżane i pocierane watą z inokulum. Próby powtarzano na 2—4 połówkach liściowych; obserwacje przeprowadzano po 3—5 dniach. W okresie badań roślinki *N. glutinosa* miały po 8—12 liści.

Siewki badano w partiach po 10 sztuk. Roślinki rozcierano w moździerzu porcelanowym z dodatkiem 10 ml wody. Inokulum z nasion przygotowywano rozcierając po 100 nasion z 10 ml wody.

Do zarażeń użyto szczepu „type” wirusa mozaiki tytoniowej, otrzymanego z Rothamsted Experimental Station w Anglii.

Dalsze szczegóły metodyczne podano przy opisie doświadczeń.

WYNIKI I DYKUSJA

Występowanie wirusa mozaiki tytoniu w nasionach pomidorów

Obserwowano pojawianie się nekroz na liściach *Nicotiana glutinosa*, zarażonych inokulum z roztartych nasion. Nekrozy pojawiały się: w miesiącach czerwcu i lipcu — 3 dnia, w sierpniu i maju 4—5 dnia. Wyniki doświadczenia zestawiono w niżej podanej tabeli.

Występowanie WMT w nasionach pomidorów

Nasiona ze zbioru	Data dośw.	Odmiana	Ilość nekroz*
1961	15.V.62	Open Air	80
„	„	Ślawa Nadrenii	54
„	„	Mory 33	83
„	27.V.62	Stonora, Wystawowe	62
„	„	Najwcześniejsze ze wszystkich	47
„	„	Sukces Mor	17
„	15.VI.62	Seelandia	5
„	„	Grandezza	3
„	15.VIII.62	Karzelek Puławski	32
„	„	Tryumf Ulricha	17
1960	15.V.62	Mory 33	5

* Średnia z 2 połówek liściowych.

Mimo że w tabeli podano przeciętne liczby nektoz, należy przyjąć, że uwiarygodnione dane przedstawiają jedynie wyniki jakościowe, świadczące o obecności wirusa mozaiki tytoniu w nasionach pomidorów i o zmienności wyników, a nie porównywalne w sensie ilościowym. Brak bowiem wszelkich danych o warunkach zbioru i przechowywania użytych w tych badaniach nasion; również metodyka doświadczenia (niedostateczna ilość powtórzeń wykonanych w jednym czasie), nie pozwala na takie porównanie.

Otrzymane wyniki wskazują, że obecność WMT u nasion pomidorów jest w Polsce zjawiskiem częstym. Fakt, że znaleziono wirus we wszystkich próbkach bez wyjątku, może nasuwać podejrzenie, że przynajmniej w roku 1961 było to zjawisko powszechne.

Próby przeprowadzone z nasionami ze zbioru w roku 1960 wskazują również, że możemy się liczyć z obecnością wirusa w starszych nasionach. Wynik ten potwierdza obserwacje zarówno Johna, jak i Nitzan'yego, którzy znajdowali WMT w nasionach przechowywanych przez 1—3 lat [16, 22]. Zmniejszenie aktywności wirusa u nasion przechowywanych przez czas dłuższy obserwowano u nasion pomidorów odmiany Mory 33; w tym przypadku posługiwano się nasionami ze zbiorów kontrolowanych, przechowywanych w torebkach papierowych w suchym pomieszczeniu, tak że przytoczone wyżej zastrzeżenia o nieporównywalności wyników ilościowych nie są w pełni aktualne. Dla dokładniejszego porównania aktywności wirusa w przechowywanych nasionach byłoby jednak potrzebne przebadanie liczniejszego materiału.

Przekazywanie WMT z nasion na siewki

Przeprowadzono doświadczenie, w którym wysiano do skrzynek ze sterylizowaną glebą silnie zawirusowane nasiona pomidorów odmiany Mory 33. Nasiona wysiano w oddzielnych partiach po około 25 nasion, rozmieszczając je na powierzchni około 100 cm². Po wykielkowaniu pozostawiono po 10 roślinek, resztę usuwając pincetą. W 30 dni po wschodach sprawdzano zawirusowanie poszczególnych partii (w próbkach zbiorowych).

Otrzymano następujące wyniki:

Na 100 zbiorowych oznaczeń, obejmujących 1000 roślin, w 95 przypadkach nie stwierdzono obecności wirusa WMT.

W 5 próbach, średnia ilość nekroz, które wystąpiły na 4 liściach *Nicotiana glutinosa*, wynosiła kolejno 2, 4, 9, 17 i 96.

W 20 próbkach stanowiących kontrolną kombinację — w których wysiano nasiona otrzymane z nie zawirusowanych owoców — nekroz nie stwierdzono.

Otrzymane wyniki wskazują, że: 1) istnieje możliwość przekazywania wirusa na siewki oraz 2) — że zarażenie zachodzi stosunkowo rzadko.

Można przypuszczać, że wirus mozaiki nie traci w pełni swej infekcyjności w czasie kiełkowania nasion i w okresie późniejszym. Do zarażenia jednak młodych roślinek zwykle nie dochodzi, prawdopodobnie z braku odpowiednich warunków ułatwiających zarażenie. Ponieważ część okryw nasiennych, po wykieł-

Ryc. 1. Występowanie WMT w nasionach pomidorów w czasie kiełkowania nasion

kowaniu nasion, wyniesiona zostaje na czubku liścieni nad powierzchnię gleby, a część zostaje pod ziemią, zarażenie mogłoby zachodzić zarówno poprzez korzenie, jak i poprzez liście. Najgroźniejszym źródłem infekcji byłby przy tym wirus obecny na powierzchni nasion, mniej groźny ten, który według C r o w l e y a i T a y l o r a występuje wewnątrz okryw nasiennych [5, 25].

W następnych doświadczeniach sprawdzono słuszność tego rozumowania. W pierwszym doświadczeniu badano, czy po wykiełkowaniu nasion można będzie stwierdzić obecność WMT w okrywach nasiennych pozostałych po wykiełkowaniu nasion zawirusowanych. Przeprowadzono 4 próby, w których rozcierano po 100 okryw nasiennych oddzielonych od młodych roślinek w 5 dniu kiełkowania.

We wszystkich próbach otrzymano wynik wskazujący na obecność wirusa. Kolejno stwierdzono 17, 16, 45 i 45 nekroz. Nasiona nie kiełkowane rozarte w podobny sposób powodowały powstanie 98 nekroz.

Wynik doświadczenia skłonił autora do przebadania aktywności wirusa w nasionach w czasie kiełkowania i w krótkim okresie po wykiełkowaniu.

Nasiona kiełkowano na bibule w partiach po 100 nasion. Po 2, 4, 8, 12, 16 i 20 dniach rozcierano nasiona (względnie okrywy nasienne) i inokulowano

liście *Nicotiana glutinosa*. Próby oznaczone liczbami 8 i dalszymi przeprowadzono na okrywach nasiennych, które po wykiełkowaniu były oddzielone od młodych roślinek i wysuszone na powietrzu. Wykonano po 4 powtórzenia doświadczeń.

Doświadczenie wykazuje stopniowe inaktywowanie wirusa w czasie kiełkowania, szczególnie w okresie od 2 do 6 dnia kiełkowania, nie doprowadzające jednak do zupełnego zaniku zdolności zarażania.

Rzadko obserwowane zarażanie się siewek wirusem przenoszonym przez nasiona nasuwa przypuszczenie, że warunkiem zarażenia mogą być mechaniczne uszkodzenia młodych roślinek. Wykonane doświadczenie opisane niżej potwierdza takie założenie.

Wysiano do skrzynek ze sterelizowaną glebą około 1200 nasion, w oddzielnych partiach po około 70 nasion w każdej. Na jedną kombinację doświadczalną przypadało 6 powtórzeń po 70 nasion. Po wykiełkowaniu pozostawiano w każdym powtórzeniu po 50 roślinek, zbędne usuwając pincetą. 30 dni po wzejściu pocierano palcami łodygi i liście młodych roślinek. O ile okrywy nasienne znajdowały się jeszcze przy liścieniach rozcierano je również w palcach. Ręce dla dezynfekcji myto wodą z mydłem i spłukiwano 10 % roztworem Na_3PO_4 . Do doświadczenia włączono kombinację kontrolną z nasionami bezwirusowymi, otrzymanymi z owoców nie wykazujących obecności wirusa w momencie zbioru. Po 10 dniach zbierano wszystkie roślinki, rozcierano w moździerzu i inokulowano liście *Nicotiana glutinosa*. Otrzymano następujące rezultaty:

Wpływ mechanicznych uszkodzeń na zdrowotność młodych siewek pomidorów

Zdrowotność nasion	Mechaniczne uszkodzenia	Ilość nekroz*
Nasiona bezwirusowe	+	0
„ zawirusowane	—	$2 \pm 2,4$
„ zawirusowane	+	$35 \pm 6,9$

* Średnia z 4 połówek liściowych oraz średnie odchylenie średniej arytmetycznej.

Mimo dużej zmienności wyników doświadczenie wydaje się wykazywać dostatecznie przekonywająco, że lekkie potarcie liści i łodyżek, powodujące nieznaczne uszkodzanie włosków liściowych, może ułatwiać zarażenie wirusem. Dowodzi ono również obecności wirusa czy to na powierzchni pocieranych organów, czy też na resztkach okryw nasiennych.

Można sądzić, że w praktyce zarażenia mogą również zachodzić dzięki innym uszkodzeniom powodowanym przez owady (także i bytujące w glebie i uszkodzające korzenie rozsady) lub zachodzącym przy pikowaniu rozsady, itp... Trudności wyeliminowania tego typu czynników były zapewne przyczyną rozbieżności wyników otrzymywanych przez różnych badaczy. Należy się też liczyć, jak to wykazał Milbrath, z różną wrażliwością odmian pomidorów na zarażenie WMT [18]. Brak szczegółowych danych o warunkach, w jakich były przeprowadzane badania cytowane w literaturze, uniemożliwiają w pełni krytyczne porównanie wyników tych badań z rezultatami osiągniętymi w niniejszej

pracy. Stwierdzić jedynie można, że między rezultatami naszych doświadczeń a wynikami badań Doolittle'a Goldina, Chamberlaina i Taylora jest zasadnicza zgodność [11, 12, 4, 25]. Nawet ci badacze, którzy jak Jones, Allard czy Nitzany, nie stwierdzili w swych doświadczeniach zarażenia siewek wirusem z nasion, możliwości takiego zarażania w normalnych warunkach uprawowych nie wykluczali [2, 17, 22].

Łączne wyniki trzech ostatnich doświadczeń wskazują zatem na to, że zarażanie siewek wirusem mozaiki, pochodzącym z nasion, jest możliwe i może stanowić niebezpieczne źródło infekcji. Ze względu na wcześniejszy termin siewu, a więc i używanie nasion krócej przechowywanych, zarażenie takie jest najbardziej prawdopodobne przy uprawach szklarniowych wczesnych pomidorów. Tu również ze względu na liczne zabiegi pielęgnacyjne spodziewać się można najszybszego rozprzestrzeniania się infekcji.

Stwierdzenie możliwości zarażenia siewek wirusem przeniesionym przez nasiona znalazło również potwierdzenie w wykonanej ostatnio pracy Taylor'a i wsp. [25]. Badania przeprowadzone równolegle w USA i Australii wykazały obecność WMT zawleczonego za pośrednictwem nasion, na powierzchni liści i korzonków. Nie przeprowadzono w tych badaniach prób doświadczalnego zarażania młodych siewek wirusem obecnym na ich powierzchni, dowiedziono natomiast metodą pośrednią, że obecny wirus jest zwykle tylko zanieczyszczeniem powierzchni organów roślinnych. Taylor wskazuje również że infekcja wirusowa może nastąpić w momencie uszkodzenia siewek przy przesadzaniu.

Wpływ różnych metod otrzymywania nasion na zawartość WMT w nasionach pomidorów

Wykonano doświadczenie, w którym porównano skuteczność 2 najczęściej polecanych metod ekstrakcji nasion — fermentacyjnej i kwasowej, dla otrzymywania z zawirusowanych owoców nasion nie zawirusowanych.

Doświadczenie przeprowadzono w 2 temperaturach: w pierwszej serii przy 18—20 °C (w piwnicy), w drugiej — w temp. 35 °C. Powtórzeń było 6, za jedną próbę uważano ekstrakcje partii 3—4 owoców. Wyniki doświadczeń zawiera zestawienie:

Metoda ekstrakcji	Wpływ różnych metod ekstrakcji nasion na zawartość WMT	
	Ilość nekroz*	
	Temperatura	
	20 °C	35 °C
Mechaniczna	96 ± 14,1	98 ± 18,1
Fermentacyjna	73 ± 19,7	35 ± 9,0
Kwasowa	73 ± 20,3	2 ± 2,4

* Średnia z 4 połówek liściowych ± średnie odchylenie średniej arytmetycznej.

Otrzymane wyniki wykazują na bardzo skuteczną inaktywację wirusa przy zastosowaniu metody „kwasowej”, ale jedynie przy podwyższonej temperatu-

rze zabiegu; pełnej inaktywacji wirusa jednak nie uzyskano. W temperaturze 20 °C inaktywacja wirusa prawie nie zachodzi.

Metoda „fermentacyjna” dała znacznie gorsze wyniki przy obu temperaturach. Nawet przy wyższej temperaturze zabiegu, obserwowano jedynie zmniejszenie się ilości nekroz o 65 %. Nie stwierdzono natomiast by przy niskich temperaturach ekstrahowania nasion zachodziło zwiększenie się zanieczyszczenia wirusami, jak to obserwował N i t z a n y [22]. Różnice między otrzymanymi wynikami mogą po prostu pochodzić ze znacznego błędu doświadczalnego w obu doświadczeniach. Krytyczne porównanie z wynikami innych badaczy nie jest właściwie możliwe, z powodu braku danych o warunkach, w jakich przeprowadzili oni ekstrakcje. Nie podaje ich H o w l e s, nie ma ich w krótkich doniesieniach S i n c l a i r a i A l e x a n d e r a; praca C h a m b e r l a i n a natomiast nie była dostępna w oryginale [15, 14, 24, 1, 4].

Inaktywacja WMT w nasionach pomidorów przechowywanych

Próby inaktywacji WMT w nasionach przechowywanych przeprowadzono po ich moczeniu w wodzie w ciągu 6 godzin. Dla wszystkich zabiegów wprowadzono jednakowy czas działania środków chemicznych: 15 minut, oraz temperatury 20 °C i 35 °C. Ponieważ, jak to wykazywały pierwsze oznaczenia, nie osiągnęto w tych warunkach pełnej inaktywacji wirusa, wprowadzono jeszcze nowe warianty — stosując w jednej serii dodatkowo środek zmniejszający napięcie powierzchniowe, w drugiej ultradźwięki. Niestety wprowadzenie dużej liczby kombinacji doświadczalnych zmusiło do ograniczenia ilości powtórzeń, których w każdej kombinacji wykonano jedynie po 2, za powtórzenie uważając przeprowadzenie prób z oddzielną porcją nasion.

Wpływ środków chemicznych na aktywność WMT w nasionach pomidorów
Stosowany środek

			Liczba nekroz*	
			Temperatura	
			20 °C	35 °C
Woda			80	95
HCl 1%			19	6
NaOH 2%			13	4
KMnO ₄ 1%			20	15
Na ₃ PO ₄ 10 %			15	5
woda	+	Netzmittel	75	91
HCl 1%	+	„	16	6
NaOH 2%	+	„	10	3
KMnO ₄ 1%	+	„	13	8
Na ₃ PO ₄ 10%	+	„	8	5
woda	+	ultradźwięki	86	—
HCl 1%	+	„	10	—
NaOH 2%	+	„	3	—
KMnO ₄ 1%	+	„	7	—
Na ₃ PO ₄ 10%	+	„	0	—

* Średnia arytmetyczna z 2 połówek liściowych.

Wynik doświadczenia, mimo że przeprowadzone ono zostało ze zbyt małą ilością powtórzeń, jest dość wyraźny — wskazuje, że żadna z polecanych metod nie daje pełnej gwarancji inaktywacji WMT w nasionach pomidorów. Wynik uzyskany z Na_3PO_4 + ultradźwięki należałoby powtórzyć. Wyraźny jest również dodatni wpływ środków przyspieszających przenikanie i zwiększanie zdolności do reakcji chemicznych — temperatury i ultradźwięków. Zarówno podwyższenie temperatury o 15°C , jak i zastosowanie ultradźwięków w dawce $4\text{W}/\text{cm}^2$ przez 15 minut nie obniżało istotnie aktywności wirusa, jak na to wskazuje wynik kombinacji, w których była tylko woda; działanie tych czynników zaznacza się natomiast wyraźnie przy łącznym użyciu środków chemicznych i fizycznych. Nie stwierdzono natomiast równie wyraźnego dodatniego działania środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe, podobnie do obserwowanego przez Rennera, przy zastosowaniu tego samego związku chemicznego w czasie dezynfekcji nasion od zarodników grzybów [23].

Otrzymane wyniki wskazują również na nieco skuteczniejsze działanie środków alkalinizujących — Na_3PO_4 i NaOH , niż zakwaszających i utleniających, jednak dokładniejsze porównanie skuteczności stosowanych zabiegów wymagałoby prób na większym materiale.

Przeprowadzenie takich prób wydaje się bardzo celowe. Należałoby ewentualnie połączyć ekstrakcję kwasową z późniejszym traktowaniem nasion różnymi środkami, z których najpraktyczniejszymi wydają się środki typu soli: Na_3PO_4 , czy K_3PO_4 , względnie sól amonowa, czy też rozcieńczone roztwory ługów. Należałoby również spróbować łącznego stosowania zapraw przeciwgrzybowych oraz sprawdzić dokładnie, jaki jest wpływ stosowanych zabiegów na wartość biologiczną nasion.

Badania wstępne zagrzybienia nasion były przeprowadzone i w czasie referowanych badań. Stwierdzono wyraźnie dodatni wpływ 2% NaOH . Badania siły i energii kiełkowania, natomiast, nie dały jasnych wyników. Z powodu bardzo słabej siły kiełkowania nasion ze zbioru w 1961 roku (przeciętnie 86%), w przeprowadzonych doświadczeniach obserwowano bardzo dużą, dochodzącą do 30% zmienność wyników. Z otrzymanych w tych warunkach rezultatów można było jedynie wyciągnąć wniosek, że istotnej różnicy między skutkiem moczenia w wodzie a skutkami działania środków chemicznych nie stwierdzono. Ultradźwięki w nieznacznym stopniu przyspieszały kiełkowanie.

Ostatnim doświadczeniem mającym na celu sprawdzenie skuteczności metod inaktywacji WMT w nasionach był wysiew nasion poddanych wypróbowanym zabiegom, z następnym sprawdzeniem zdrowotności młodych siewek.

Do wysiewu wzięto nasiona z pierwszej serii prób, w której stosowano środki chemiczne w roztworach wodnych bez dodatkowych czynników (temp. 20°C), i w której, jak na to wskazywały zamieszczone wyniki liczbowe, uzyskano najslabszą inaktywację WMT. Doświadczenie wykonano w 4 powtórzeniach, wysiewając po około 200 nasion z każdej serii do skrzynek ze sterylizowaną glebą. Sprawdzenie ewentualnej obecności wirusa wykonano po 35 dniach.

Do badań brano wszystkie roślinki każdej kombinacji. Otrzymanym sokiem nacierano 2 połówki liści *Nicotiana glutinosa*. Dwie serie kontrolne stanowiły roślinki wyhodowane: pierwsza z nasion bezwirusowych, druga z nasion zawirusowanych, moczonych w wodzie. Obserwacje przeprowadzone po 5 dniach wykazywały, że siewki pochodzące z nasion zawirusowanych, moczonych w wodzie były w nieznacznym stopniu nosicielami wirusa mozaiki. Średnia ilość nekroz wynosiła 13.

Roślinki otrzymane z nasion traktowanych 1 % HCl, 2 % NaOH, 1 % KMnO_4 i 1 % Na_3PO_4 — wykazywały we wszystkich próbach 0 % nekroz podobnie jak i roślinki kontrolne, otrzymane z bezwirusowych nasion.

Otrzymany wynik wskazuje na pełną skuteczność stosowanych zabiegów dla zabezpieczenia siewek przed zarażeniem WMT, przenoszonym za pośrednictwem nasion.

Wytlumaczenie rozbieżności wyniku ostatniego doświadczenia z rezultatami poprzednich, w których nie obserwowano pełnej inaktywizacji WMT w nasionach, szukać należy — zgodnie z ostatnimi wynikami badań T a y l o r a — w fakcie, że zarażenie siewek zachodzić może tylko przez wirus obecny na powierzchni nasion [25]. Częsteczki wirusa znajdujące się tu są prawdopodobnie w 100 % inaktywowane stosowanymi środkami, podczas gdy te, które znajdują się wewnątrz okryw nasiennych, oraz niewielkie ilości w endospermie i które nie mogą powodować zarażenia — pozostają aktywne, prawdopodobnie z powodu niedotarcia do nich środków inaktywujących. Przy rozcieraniu nasion przed inokulacją liści *N. glutinosa*, stosowanym w poprzednich doświadczeniach, te właśnie cząsteczki wirusa powodowały zarażenie się liści roślin testowych.

WNIOSKI

1. Znajdujące się w handlu nasiona pomidorów były w latach 1961 i 1962 silnie zarażone wirusem mozaiki tytoniu.

2. Nasiona pomidorów zarażone wirusem mozaiki tytoniu mogą być źródłem infekcji siewek pomidorowych, choć infekcja za pośrednictwem nasion zachodzi rzadko.

3. Ekstrahowanie nasion pomidorów z rozdrobnionej pulpy owocowej, przeprowadzone w środowisku zawierającym HCl w stosunku 100 ml stężonego HCl o c. wł. 1,4 na 5 kg owoców, przy temperaturze zabiegu 35°C i 2 godzinach działania kwasu, powoduje inaktywację wirusa bliską 100 %.

4. Moczenie nasion zawirusowanych w roztworach 1 % HCl, 2 % NaOH, 1 % KMnO_4 i 10 % Na_3PO_4 , przy temperaturach 20°C i 35°C, powoduje inaktywację wirusa mozaiki tytoniu dostateczną dla zabezpieczenia siewek otrzymywanych z tych nasion przed zarażeniem wirusowym.

SUMMARY

1. The tomato seed of the 1961 crop was found to be infected with tobacco mosaic virus. Ten varieties were tested after storage of the seed for one year, and one variety after two years' storage.

2. Some of the seedlings obtained from the seed contaminated with the tobacco mosaic virus were infected with it when tested 35 days after the germination. The incidence of the disease among the seedlings was very small at this time. It was found that a slight injury produced by rubbing the plantules with finger tips favored the infection of the seedlings raised from infected seed whereas it was without effect on the seedlings raised from virus-free seed.

3. The rate of the inactivation of the tobacco mosaic virus was followed. The greatest loss of infectivity was found after 2—6 days of germination.

4. The extraction of the seed from the fruit pulp by mechanical, fermentative and acidification processes was carried out. It was found that the acidification carried out at 35 °C secured the seed with smaller virus contamination. The fermentative process was less effective.

5. The following seed treatments were used for the inactivation of tobacco mosaic virus in dry tomato seed: a dipping for 15 minutes in solutions of 1% HCl, 2% NaOH, 1% KMnO_4 and 10% Na_3PO_4 (after previously soaking the seed in water for 6 hours). The temperature of the bath was fixed at 20 °C in the first series and at 35 °C in the second. The best results were obtained with the higher temperature and with the combined use of the chemicals and ultrasonic radiation used during the 15 minutes treatment. The intensity of the radiation was 4 W/cm_2 at 800 kH. The radiation alone was without effect on virus infectivity. A slightly better inactivation was obtained with the use of Na_3PO_4 and NaOH, than with other chemicals.

6. The effectiveness of seed treatments for raising virus-free seedlings from infected seed was checked. It was found that all processes were fully effective in this respect.

LITERATURA

1. Alexander L. J., 1960, Inactivation of tobacco mosaic virus from tomato seed, *Phytopath.* 42 : 463.
2. Allard H. A., 1916, The mosaic disease of tomatoes and petunias, *Phytopath.* 6 : 328—355.
3. Canova A., 1954, A deformity of tomato fruit due to virus infection in Italy, *FAO Plant Prot. Bull.*, 2 : 17—19 (Rev. Appl. Mycol., 1955, p. 618).
4. Chamberlain E. E., Fry P. R., 1951, Influence of methods of tomato seed extraction and seed transmission of tobacco mosaic and tomato streak, *N.Z.J. Sci. Techn.*, Sec. A. 32 (2) : 19—32 (*Hort. Abstr.* 1952, p. 80).
5. Crowley N. C., 1957, Studies on the seed transmission of plant virus diseases, *Austr. J. Biol. Sci.* 10 : 449—463.
6. Bennet C. W., 1956, Biological relations of plant viruses, *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 7 : 143—170.
7. Berkeley G. H., Madden G. O., 1932, Transmission of streak and mosaic diseases of tomato through seed, *Scient. Agric.*, 13 : 194—7 i 455—458.
8. Bewley W. F., Corbett W., 1930, The control of cucumber and tomato mosaic in glasshouses by the use of clean seed, *Ann. Appl. Biol.* 17 : 463—485.
9. Boyle J. S., Wharton D. C., 1957, The experimental reproduction of tomato internal browning by inoculation with strain of tobacco mosaic virus, *Phytopath.* 47 : 199—207.
10. Brock D., 1952, The use of trisodium phosphate as an inactivating agent to plant viruses, *J. Austr. Inst. Agric. Sci.* 18 : 41—43.

11. Doolittle S. P., Beecher F. S., 1937, Seed transmission of tomato mosaic following the planting of freshly extracted seed, *Phytopath.* 27: 800—801.
12. Goldin M. I., 1939, O możliwości pieradači wirusa mozaiki tabaka siemienami tomata. *Mikrobiol.* 8: 613—616.
13. Howles R., 1953, Virus diseases therapy, *Ann. Rep. Cheshunt Exp. and Res. Sta.*, 1952—53, p. 26—33.
14. Howles R., 1957, Attempts in the chemotherapy of virus-infected glasshouse plants, *Plant Pathol.* 6: 46—48.
15. Howles R., 1961, Inactivation of tobacco mosaic virus on tomato seeds, *Plant Pathol.* 10: 160—161.
16. John C. A., Sova C., 1955, Incidence of tobacco mosaic virus on tomato seed, *Phytopath.* 45: 636—638.
17. Jones L. K., Burnett G., 1935, Virus diseases of greenhouse-grown tomatoes, *Wash. St. Agric. Exp. Sta. Bull.* 308: 1—36 (*Biol. Abstr.* 1936 p. 1368).
18. Milbrath J. A., 1937, An indication of seed transmission of mosaic in tomato seed. *Phytopath.*, p. 868—9.
19. Milinko I., 1956, Vizsgalatok es vedekezési kísérletek a paradicsom vi usbete gsegeinek lekuzdesere. *Novenytermeles* 2: 165—176.
20. Moycho W., Gubański M., Fomaidis B., Lemańska M., Wajsbard E., 1960, Występowanie wirusa mozaiki tytoniowej na plantacjach pomidorów m. Łodzi i okolicy, *Postępy Nauk. Roln.* 61 (1): 79—82.
21. Moycho W., Niemyski K., 1962, Wpływ porażenia wirusem mozaiki tytoniowej na plon i skład chemiczny pomidorów, *Acta Agrobotanica* 12.
22. Nitzany F., 1960, Transmission of tobacco mosaic virus through tomato seed and virus inactivation by methods of seed extraction and seed treatments, *Ktavim* 10: 63—67.
23. Rennert A., 1962, Doniesienie ustne.
24. Sinclair J. B., 1959, Reduction of tobacco mosaic virus in tomato seed by fermentation. *Phytopath.* 49: 551.
25. Taylor R. H., Grogan R. G., Kimble K. A., 1961, Transmission of TMV in tomato seed. *Phytopath.* 51: 837—842.
26. Uschdraweidt H., 1951, Viruskrankheiten der Tomaten, *Phytopath. Zeitschrift* 18: 231—245.