

УДК 632.38.07: [633.16+635.64

ДИАГНОСТИКА ВИРУСОВ В СЕМЕНАХ ТОМАТА И ЯЧМЕНЯ

В. А. ШМЫГЛЯ, С. И. ЮНИС

(Кафедра фитопатологии)

Семена — один из основных передатчиков вирусов растений. В настоящее время известно около 90 вирусов, распространяющихся семенами [7]. Среди них особенно вредоносными для культурных растений являются вирус табачной мозаики на томатах, вирус штриховатой мозаики ячменя, вирус огуречной мозаики (ВОМ-2) на огурце, вирус обыкновенной мозаики фасоли и некоторые другие.

Особая опасность распространения вирусов семенами обусловлена рядом причин. Во-первых, семенная инфекция, как правило, более вредоносна, чем контактно-механическая и векторная, поскольку инфекционный процесс начинается еще до начала жизни растения, во время формирования семени и зародыша. Во-вторых, она может распространяться на любые расстояния при перевозках зараженного семенного материала и вирусы, содержащиеся в семенах, могут быть завезены в те страны и районы, где их раньше не было. В-третьих, пока не существует методов, дающих возможность воспрепятствовать передаче вирусной инфекции от материнского растения семенам; далеко не всегда удается отобрать здоровые растения для получения безвирусных семян, например, при сплошном заражении посевов, в селекции, при размножении новых сортов и в других случаях.

Проверка семян многих культур на отсутствие вирусной инфекции крайне необходима в селекции и семеноводстве, особенно при размножении новых сортов, а также в карантинной службе. Методы диагностики зараженности семян должны обеспечивать достаточную достоверность результатов, быть малотрудоемкими и легкоприменимыми в широкой практике. При разработке таких методов возникает ряд трудностей, связанных с недостаточной изученностью механизма передачи вирусов семенами.

Известно, что свойства вирусов в семенах отличаются от свойств тех же вирусов в вегетирующих растениях. Для диагностики важны прежде всего состояние, концентрация и локализация вируса в семенах. Известны три формы локализации:

1. Вирус находится главным образом в зародыше, реже и в меньшем количестве — в эндосперме, например, вирус штриховатой мозаики ячменя в его семенах [4, 8].

2. Вирус локализуется на поверхности и в толще кожуры семян, иногда проникает в эндосперм, но никогда не обнаруживается в зародыше, например, вирус табачной мозаики в семенах томата [3].

3. Вирус может обнаруживаться во всех частях семени: зародыше, эндосперме, наружных покровах. Примерами могут служить некоторые вирусы, поражающие бобовые культуры, в частности, вирус обыкновенной мозаики фасоли [6].

Задача нашей работы заключалась в том, чтобы путем испытания различных вариантов серологической диагностики в сравнении с индикаторной найти такую методику диагностики вируса табачной мозаики

ки (ВТМ) в семенах томата и вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) в семенах ячменя, которая отвечала бы указанным выше требованиям.

Методика

На томатах испытана диагностика ВТМ в осветленной суспензии сухих, набухших и наклюнувшихся семян, проростков в начале развития семядольных листочков и при полном их развитии. Результаты капельного, капиллярного и латекс-капиллярного методов серодиагностики ВТМ в семенах и проростках сравнивали с индикаторной диагностикой вируса в том же материале на листьях дурмана (*Datura stramonium* L.) и клейкого табака (*Nicotiana glutinosa* L.). Капиллярный метод серодиагностики применялся в оригинальной модификации с использованием плоских разборных капилляров, состоящих из двух тонких стеклянных пластинок с прокладкой из полимерной пленки по краям. Анализируемая жидкость входит в капиллярный просвет между пластинками, где смешивается с диагностической сывороткой. Плоский капилляр позволяет анализировать очень малые количества суспензии — около 0,01 мл, при этом

можно обходиться без осветления жидкости. В тонком слое (0,2—0,3 мм) даже слабые серологические реакции хорошо видны при небольшом увеличении. Сенситивизированную суспензию латекса для диагностики ВТМ и ВШМЯ готовили по методике Беркса [2].

Для диагностики ВШМЯ в семенах и проростках ячменя применяли те же методы, что и на томатах, но дополнительно анализировали суспензии зародышей, выделенных из набухших семян. Индикаторная диагностика ВШМЯ проводилась на мари гигантской (*Chenopodium amaranticolor* Cost. et Reyn.) и мари киноа (*Ch. guinoa* L.).

Для определения серологического титра и концентрации инфекционных частиц исследовали суспензию групповых проб — 20 семян или проростков, для определения процента зараженности — суспензию отдельных семян или проростков.

Результаты

Как показала серодиагностика ВТМ в семенах и проростках томата, вирус находится в довольно высокой концентрации в суспензии сухих и набухших семян, однако в суспензии проростков он не обнаруживается даже при использовании латекс-капиллярного метода, хотя чувствительность его в 4—8 раз выше, чем капельного (табл. 1).

Различия результатов, полученных при помощи разных методов, по проценту положительных реакций при анализе суспензии отдельных семян и проростков значительно меньше различий титра вируса в суспензии групповых проб. В этом случае также не было обнаружено серологической активности вируса в суспензии проростков из зараженных семян (табл. 2).

Процент положительных реакций отражает не внутреннюю зараженность семян, а их контаминацию вирусом из пульпы зараженных

Таблица 1

Титры серологических реакций при анализе семян и проростков томата на зараженность ВТМ (групповые пробы)

Суспензия	Капельный метод	Капиллярный метод	Латекс-капиллярный метод
Семян:			
сухих	64	256	512
набухших	64	256	256
наклюнувшихся	8	32	64
Проростков:			
6-дневных	0	0	0
12-дневных	0	0	0

Таблица 2

Результаты серодиагностики ВТМ в суспензии отдельных семян и проростков томата (% положительных реакций)

Суспензия	Капельный метод	Капиллярный метод	Латекс-капиллярный метод
Семян:			
сухих	48,3	56,6	65,0
набухших	45,0	53,3	61,6
наклюнувшихся	33,0	38,3	50,0
Проростков:			
6-дневных	0	0	0
12-дневных	0	0	0

плодов. Отсутствие серологической реакции в суспензии проростков можно объяснить тем, что вирус в них находится в очень низкой концентрации или в необычной форме, и накопление его заторможено. По-видимому, инфицирование проростков происходит не путем простого их контакта с зараженной кожурой семян во время прорастания, как считают некоторые авторы [3], так как при контактном заражении проростков ВТМ вирус быстро накапливается в них в высокой концентрации. Ранее было установлено, что в зародышах непроросших семян из зараженных плодов ВТМ полностью отсутствует, и сделан вывод, что вирус вероятнее всего переходит в развивающийся зародыш из эндосперма во время прорастания, но ингибиторы вирусов, содержащиеся в проростках, подавляют развитие инфекционного процесса [5].

Результаты индикаторной диагностики на листьях *N. glutinosa* были сходными с полученными методами серодиагностики: при инокуляции листьев суспензией сухих и наклюнувшихся семян обнаружено 18,2 и 17,8 некроза в среднем на лист, а суспензией проростков — не было ни одного. Однако последнее не дает основания судить о полном отсутствии вируса в проростках.

С целью выяснения вопроса о зараженности проростков их прививали на здоровые молодые растения томата из семян, свободных от ВТМ. При этом соблюдались меры предосторожности от случайного перезаражения (руки и инструменты дезинфицировали после каждой прививки). Из 50 привитых растений 3 оказались зараженными ВТМ (6%), в контроле зараженных растений не было.

Как мы видим, истинный процент передачи ВТМ семенами томата не так высок, как можно было ожидать исходя из результатов серодиагностики вируса в суспензии непроросших семян. Однако, зная высокую контагиозность этого вируса и быстрое его распространение в культуре томата, можно считать, что передача даже менее 1% может обеспечить массовое заражение растений уже к середине вегетации. Отсюда следует, что приемы, только снижающие зараженность семян томата ВТМ, не достигают основной цели — защиты культуры от инфекции. Поэтому в промышленной культуре, особенно в теплицах, должны использоваться полностью здоровые семена. Такие семена могут быть получены, в частности, путем выращивания растений из изолированных зародышей [1].

Т а б л и ц а 3

Титры серологических реакций при анализе семян и проростков ячменя на зараженность ВШМЯ (групповые пробы)

Суспензия	Капельный метод	Капиллярный метод	Латекс-капиллярный метод
Семян:			
сухих	0	1	4
набухших	0	1	8
Зародышей	32	64	256
Наклюнувшихся семян	32	32	64
Проростков:			
6-дневных	128	256	512
8- »	256	512	1024
12- »	512	1024	1024

Т а б л и ц а 4

Результаты серодиагностики ВШМЯ в суспензии отдельных семян и проростков ячменя (% положительных реакций)

Суспензия	Капельный метод	Капиллярный метод	Латекс-капиллярный метод
Семян:			
сухих	0	0	10,0
наклюнувшихся	13,3	20,0	33,3
Проростков:			
6-дневных	41,6	51,6	60,0
8- »	50,0	61,6	65,0
12- »	63,3	66,6	75,0

Результаты серодиагностики ВШМЯ в семенах ячменя (табл. 3) показали, что вирус может быть обнаружен в суспензии непроросших семян капиллярным и латекс-капиллярным методами, при этом титры реакций близки к пределам чувствительности этих методов. При невысокой зараженности партии семян результат анализа групповых проб может быть отрицательным, поэтому достоверность серодиагностики ВШМЯ в суспензии целых семян нельзя считать достаточной. Концентрация вируса в суспензии зародышей намного выше и позволяет уверенно диагностировать зараженность всеми испытанными методами серодиагностики.

С началом прорастания семян концентрация вируса быстро увеличивается, поэтому серодиагностика ВШМЯ в проростках 8—12-дневного возраста значительно более достоверна, чем в суспензии целых семян и в начале прорастания. Для более точного сравнения достоверности капиллярного, капиллярного и латекс-капиллярного методов анализировали суспензию отдельных семян и проростков ячменя. Из табл. 4 видно, что достоверность серодиагностики ВШМЯ в суспензии целых непроросших семян неудовлетворительна, но с возрастом проростков процент положительных реакций увеличивается. Наибольшее число положительных реакций (75 %) дал латекс-капиллярный метод. Этот результат близок к полученному индикаторным методом на листьях *Chenopodium quinoa* при анализе 12-дневных проростков (81,6 %).

Выводы

1. Вирус табачной мозаики может быть обнаружен в суспензии непроросших семян томата серологическим и индикаторным методами, при этом диагностируется пассивная вирусная контаминация семян, указывающая на наличие истинной их зараженности.

2. Вирусная инфекция в проростках томата из зараженных семян находится в ингибированной форме и, как правило, не обнаруживается обычными методами диагностики.

3. Зараженность семян ячменя вирусом штриховатой мозаики может с достаточной достоверностью диагностироваться серологическим методом при анализе сока или суспензии проростков в возрасте 8—12 дней.

4. В экстренных случаях для диагностики ВШМЯ может использоваться суспензия зародышей, извлеченных из набухших семян.

5. Для серологического анализа растительных образцов малого объема, отдельных семян и проростков целесообразно использовать метод плоских капилляров и латекс-капиллярный метод.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шмыгля В. А., Макаев С. Ш. Получение семян помидора, свободных от вирусной инфекции. — Докл. ТСХА, 1979, вып. 251, с. 156—158. — 2. Bercks R. — *Phytopathologische Z.*, 1967, Bd 58, H. 1, S. 1—13. — 3. Broadbent L. — *Annales of applied Biol.*, 1965, vol. 56, N 2, p. 117—205. — 4. Fulton R. W. In: *Plant Virology* (ed. M. Corbett a. H. Sisler), 1964. — 5. Gendron J., Kassanis B. — *Annales of applied Biol.*, 1954, vol. 41, p. 183—188. — 6. Jafarpour B., Shephard R. J., Grogan R. G. — *Phytopathology*, 1979, vol. 69, p. 1125—1129. — 7. Phatak H. — In: *Seed pathology — problems and progress*, 1979, p. 141—146. — 8. Slack S. A., Shephard K. J. — *Phytopathology*, 1975, vol. 65, p. 948—955.

Статья поступила 21 мая 1981 г.