Wyciąg z porostu *Cetraria islandica* inhibitorem wirusa mozaiki tytoniowej

An extract from the lichen Cetraria islandica as an inhibitor of TMV

W. MOYCHO, M. GUBAŃSKI, A. RENNERT

WSTĘP

Reprodukcja wirusów roślinnych jest hamowana przez wiele związków syntetycznych oraz wyizolowanych z różnych organizmów. Do związków syntetycznych należą między innymi pochodne puryn: azoguanina, amino-adenina oraz pirymidyn: tiouracyl (Kassanis a. Bawden 1954, Matthews 1955). Mechanizm działania tych związków w świetle badań Matthews a (1955) polega na sterylizacji kwasu nukleinowego wirusów wywołanej wniknięciem antymetabolitów zasad. Inne związki, takie jak zieleń malachitowa (Takahashi 1948), tiosemikarbazon (Tokuzo Hirai 1958), kwas naftalenooctowy (Kutsky a. Rowlins 1950, Kutsky 1952), pochodne karbamatu (Porter, Smale, Preston, Mitchell 1957), hamują reprodukcję wirusów w bardzo małych stężeniach. Mechanizm działania tych związków nie jest dobrze poznany, dotychczasowe badania jednak wskazują, iż działają one na wirusy poprzez metabolizm rośliny.

Występowanie inhibitorów wirusowych stwierdzono w ekstraktach z różnych roślin zarówno wyższych, jak i niższych. Wśród roślin wyższych wyciągi osobiście z liści szpinaku i buraka (Grant 1934) odznaczają się silnym działaniem antywirusowym. Rośliny niższe, jak grzyby, zawierają dość często substancje tego typu. Price i Gupta (1950) stwierdzili u 10 spośród 49 przebadanych gatunków grzybów występowanie substancji antywirusowych. Większość z nich działa inaktywująco na wirusy tylko *in vitro*, rzadko natomiast *in vivo*. Bawden i Freeman (1952)

wyzolowali z kultur grzyba *Trichothecium roseum* inhibitory: trichotecinę o wzorze cząsteczkowym $C_{19}H_{24}O_5$ oraz wielocukier, którego głównym składnikiem jest d-galaktoza, natomiast Kassanis i Kleczkowski (1948) z rośliny *Phytolacca esculenta* (Rodz. *Phytolacaceae*) glikoproteid.

Przykładem związków hamujących reprodukcję wirusów *in vivo* są wyizolowane przez Graya (Gray 1957, Kutskey a. Rawlins 1950) z kultur grzyba *Nocardia noformica* — noformicina oraz ze *Streptomyces* sp. — cytowiryna. Podobnie działające związki stwierdzili Slagle i wsp. (1954) w kulturze grzyba *Neurospora*.

Jak widać z podanych przykładów, inhibitory wirusowe są rozpowszechnione w świecie roślinnym.

Swoistą grupę roślin stanowią porosty, w których stwierdzono związki działające antybiotycznie na drobnoustroje, natomiast nie spotyka się danych dotyczących występowania w nich inhibitorów wirusowych.

W pracy niniejszej stwierdzono obecność inhibitora wirusa mozaiki tytoniowej w poroście płucnica islandzka (*Cetraria islandica*).

METODYKA

Zawiesinę wirusa otrzymywano w następujący sposób: 2 g liści *Nicotiana tabacum* z dobrze zaznaczoną mozaiką (zakażonych co najmniej 3 tygodnie przed doświadczeniem) rozcierano w moździerzu wobec 30 ml 1/15 M buforu fosforanowego o pH ca 7. Następnie odwirowywano przy 2000 g do otrzymania klarownej zawiesiny WMT.

Inhibitor ekstrahowano z płucnicy islandzkiej następująco: sproszkowaną plechę porostu zalewano buforem fosforanowym (pH ca 8) w stosunku 10 ml/g poddając ekstrakcji przez jedną dobę. Po odsączeniu otrzymywano klarowny, lekko kwaśny wyciąg o barwie mocnej herbaty.

Aktywność wirusa oznaczano na liściach *Nicotiana glutinosa* hodowanej w szklarni. W tym celu połówki liściowe, względnie całe liście, zakażono zawiesiną wirus-antybiotyk przez wcieranie tamponem z waty, po uprzednim posypaniu liści karborundem. Liście kontrolne traktowano zawiesiną wirusa o tym samym stężeniu, ale bez inhibitora.

W innej serii doświadczeń spryskiwano całe liście inhibitorem, a zakażano je WMT dopiero po upływie określonego czasu (kilka lub kilkanaście godzin). Uwzględniono także kombinację odwrotną: zakażone już wirusem liście spryskiwano inhibitorem po krótszym lub dłuższym okresie czasu. Przy badaniu własności inhibitora porostowego poddawano go działaniu temperatury 60—100—120°, a także dializowano w woreczku celofanowym w ciągu 24 godzin.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W doświadczeniach wstępnych z lipca 1957 roku można było stwierdzić, że zawiesina WMT w buforze fosforanowym o pH ca 6,5 pozostawiona przez 24 godziny w obecności wyciągu z *Cetraria islandica* ulega całkowitej inaktywacji.

Stosunek zawiesiny wirusowej do wyciągu porostowego wynosił 1 : 1. Aktywność wirusa mierzono ilością nekroz powstałych na liściach *Nicotiana glutinosa*. Wyniki te ilustruje tabela 1. Istotnie, jak wynika z tych

Tabela 1

Działanie wyciągu z *Cetraria islandica* na aktywność WMT *in vitro*
Influence of extract from *Cetraria islandica* on activity of TMV *in vitro*

	Kontrola Control	Wirus + inhibitor Virus + inhibitor
Suma nekroz na 8 połówkach liści Number of necroses on 8 halves of leaves	357	0

doświadczeń, po 24 godzinach działania inhibitor całkowicie inaktywuje WMT. Na 8 połówkach kontrolnych powstało łącznie nekroz 357, podczas gdy na tej samej ilości poówek doświadczalnych nie powstała ani jedna nekroza.

Celem następnego doświadczenia było określenie ewentualnej zależności między stężeniem wyciągu z badanego porostu a stopniem inaktywacji WMT. W tym celu wyjściowy roztwór inhibitora rozcieńczano buforem fosforanowym w stosunku 1 : 10, 1 : 100, 1 : 500. Roztworami tymi działano na WMT *in vitro* w ciągu kilku godzin. Aktywność wirusa oznaczano jak poprzednio. Wyniki doświadczeń załączono w tabeli 2.

Tabela 2

Działanie wyciągu z *Cetraria islandica* na WMT w zależności od rozcieńczenia

Action of different dilutions of the extract from *Cetraria islandica* on TMV

	Kontrola Control	Rozcieńczenia wyciągu Dilution of the extract			
		1 : 500	1 : 100	1 : 10	1 : 1
Suma nekroz na 6 liściach Number of necroses on 6 leaves	976	351	265	63	4

Z doświadczeń wynika, że rozcieńczenie zmniejsza siłę działania inhibitora, jednak w stopniu stosunkowo nieznacznym. Załączone zdjęcie (ryc. 1) przedstawia jedną z sześciu serii przeprowadzonych doświadczeń.

Ryc. 1. Działanie wyciągu z *Cetraria islandica* na WMT w zależności od rozcieńczenia
Action of *Cetraria islandica* extract on TMV according to dilution

K — Liść zakażony zawiesiną WMT rozcieńczoną w stosunku 1:1 buforem fosforanowym. Pozostałe liście zakażono zawiesiną WMT z odpowiednio rozcieńczonym inhibitorem

K — Leaf infected with suspension of TMV diluted in proportion 1:1 with phosphate buffer. Remaining leaves were infected with suspension of respectively diluted inhibitor

W dotychczasowych doświadczeniach inaktywację WMT przeprowadzano *in vitro*. W celu wyjaśnienia, czy badany inhibitor może *in vivo* zabezpieczyć roślinę przed zakażeniem wirusowym, wykonano następujące doświadczenie: całe liście *Nicotiana glutinosa* spryskiwano inhibitorem, a po upływie 3 i 20 godzin zakażono zawiesiną wirusa. Analogiczne doświadczenie uwzględniało kombinację odwrotną: uprzednio zakażone liście spryskiwano inhibitorem po upływie 10 i 30 minut oraz 3 i 20 godzin. Wyniki zamieszczono w tabeli 3.

Rośliny potraktowane antybiotykiem 20 godzin przed doświadczeniem wykazują minimalną ilość nekroz w porównaniu z kontrolą, co świadczy o silnej inaktywacji wirusa. Efekt ten jest słabszy, aczkolwiek jeszcze uchwytany w przypadku liści spryskanych inhibitorem 20 godzin po zakażeniu. Kombinacje: antybiotyk 20 godzin przed zakażeniem i 20 godzin po zakażeniu ilustruje zdjęcie (ryc. 2).

Wynika stąd, że inhibitor występujący w *Cetraria islandica* wybitnie osłabia rozwój WMT w liściach *Nicotiana glutinosa*, zwłaszcza o ile jest stosowany przed zakażeniem. Działanie jego słabnie przy stosowaniu po dłuższym czasie od zakażenia (20 godzin), a więc wówczas, gdy zawirusowanie rośliny jest silniejsze. Podobne zjawisko obserwowano wielokrotnie (Bawden a. Freeman 1952, Gray 1955, 1957, Matthews 1955), przy czym mechanizm działania inhibitora tłumaczono w dwojaki sposób:

1. Inhibitor działa bezpośrednio na wirusa *in vitro* bądź na receptory wirusowe w trakcie jego przenikania do komórki. Koncepcja ta tłumaczyłaby zjawisko słabnięcia wpływu inhibitora na rozwój wirusa w miarę

Ryc. 2. Działanie inhibitora z *Cetraria islandica* na WMT *in vivo* 20 godzin przed i 20 godzin po zakażeniu

Action of inhibitor from *Cetraria islandica* *in vivo* on TMV 20 hours before and 20 hours after infection

1 — Liść spryskany inhibitorem 20 godzin przed zakażeniem; 2 — liść spryskany inhibitorem 20 godzin po zakażeniu; 3 — kontrola

1 — Leaf sprayed with inhibitor 20 hours before infection; 2 — Leaf sprayed with inhibitor 20 hours after infection; 3 — Control

Tabela 3

Działanie wyciągu z *Cetraria islandica* na WMT *in vivo*
Action of extract from *Cetraria islandica* on TMV *in vivo*

	Kontrola Control	1	2	3	4	5
Suma nekroz na 6 liściach	513	11	51	84	79	209
Number of necroses on 6 leaves						

1 — Liście spryskane: 20 godzin przed zakażeniem; 2 — 10 minut po zakażeniu; 3 — 30 minut po zakażeniu; 4 — 3 godziny po zakażeniu; 5 — 20 godzin po zakażeniu

1 — Leaves sprayed: 20 hours before infection; 2 — 10 minutes after infection; 3 — 30 minutes after infection; 4 — 3 hours after infection; 5 — 20 hours after infection

upływu czasu od zakażenia (Bawden a. Freeman 1952, Kassanis a. Bawden 1954).

2. Inhibitor działa na wirusa pośrednio przez metabolizm roślinny hamując procesy prowadzące do syntezy wirusa. W tym przypadku inhibitory hamują reprodukcję wirusa również po dłuższym czasie od zakażenia (Gray 1955, 1957, Slagle i wsp. 1954).

Doświadczenia nasze mogłyby nasuwać pewne zastrzeżenia, czy działanie inhibitora na rozwój wirusa zachodzi wewnątrz liścia, czy też na jego powierzchni. Aby to wyjaśnić, liście spryskiwano inhibitorem od strony dolnej, wirusa natomiast wprowadzano poprzez górną stronę liścia. Dla porównania wykonano analogiczne doświadczenie stosując inhibitor razem z wirusem od góry. W obu przypadkach otrzymano bardzo podobne wyniki.

Ze względu na powyższe wyniki oraz na możliwość obecności w wyciągu kilku związków czynnych w stanie obecnym, nie można ściśle określić mechanizmu działania inhibitora z *C. islandica*. Jednak nasuwa się prosty wniosek, że badany inhibitor inaktywuje wirusa nie tylko *in vitro*, lecz także wewnątrz liścia podobnie jak noformicina i cytowiryna wyizolowane z kultur grzybowych przez Graya.

W świetle powyższych badań stwierdzić można wyraźne, hamujące działanie fosforanowego wyciągu z *Cetraria islandica* na reprodukcję WMT. Wyodrębnienie aktywnej substancji będzie przedmiotem dalszych badań. Na razie można zaznaczyć, że działanie temperatury 60—120° nie osłabia aktywności inhibitora, o czym świadczą wyniki zawarte w tabeli 4.

Tabela 4

Wpływ temperatury na aktywność inhibitora z *Cetraria islandica*
Influence of temperature on activity of the inhibitor from *Cetraria islandica*

	Kontrola Control	Podgrzewanie przez 15' Heating within 15'		
		60°	100°	120°
Suma nekroz na 10 liściach Number of necro- ses on 10 leaves	542	14	16	21

48-godzinna dializa zmniejsza aktywność badanego inhibitora o około 40% (tab. 5).

Doświadczenia te wykazują, że czynnik działający na wirusa jest termostabilny i ulega częściowej dializie. Nasuwa się przypuszczenie, że sub-

stancją aktywną w wyciągu z *Cetraria islandica* mogą być kwasy porostowe. Dla sprawdzenia powyższej hipotezy wykonano doświadczenie z kwasami porostowymi otrzymanymi metodą K l o s y (cytowaną przez Mordarskiego 1955). 0,1% roztwór tej substancji działa na WMT

Tabela 5

Wpływ dializy na aktywność inhibitora z *Cetraria islandica*
Influence of dialise on *Cetraria islandica* inhibitor activity

	Kontrola Control	Wyciąg dializowany + WMT Dialized extract + TMV
Suma nekroz na 10 liściach Number of necro- ses on 10 leaves	1875	718

po 4-godzinnyim okresie inaktywacji następująco: na 7 połówkach kontrolnych otrzymano nekroz 408, na 7 doświadczalnych 121. Wyniki te mogą przynajmniej częściowo potwierdzić zależność antywirusowego działania wyciągu z płucnicy islandzkiej od obecności kwasów porostowych.

WNIOSKI

1. Metodą nekroz miejscowych na liściach *Nicotiana glutinosa* stwierdzono w poroście *Cetraria islandica* występowanie inhibitora względem WMT.

2. Buforowy wyciąg z *Cetraria islandica* (1 g suchego porostu na 10 ml buforu) rozcieńczony w stosunku 1 : 500 wykazuje jeszcze dość silną aktywność anty WMT.

3. Inhibitor ten stosowany przed zakażeniem chroni *Nicotiana glutinosa* przed powstawaniem nekroz, natomiast stosowany po zakażeniu redukuje tylko ilość powstających nekroz.

4. Próby wstępne dotyczące natury badanego inhibitora wskazują, iż jest on odporny na temperaturę 120° oraz że wykazuje częściowe osłabienie aktywności wskutek dializy.

5. Wydaje się prawdopodobne, iż działanie wyciągu z *Cetraria islandica* na WMT jest związane przynajmniej częściowo z obecnością kwasów porostowych.

STRESZCZENIE

W pracy niniejszej badano działanie na wirusa mozaiki tytoniowej wyciągu z porostu *Cetraria islandica*. Wyciąg ten otrzymywano na drodze 24-godzinnej ekstrakcji sproszkowanego porostu buforem fosforanowym o pH ca 8, w temperaturze pokojowej. Aktywność WMT określano na liściach *Nicotiana glutinosa* metodą nekroz miejscowych.

WMT zmieszany z wyciągiem porostowym nie wykazuje żadnej aktywności: na 6 połówkach kontrolnych powstało nekroz 357, na doświadczalnych 0. Inhibitor wyjściowy rozcieńczony w stosunku 1:500 hamuje znacznie aktywność wirusa. Inhibitor stosowany przed zakażeniem chroni roślinę (*Nicotiana glutinosa*) przed powstawaniem nekroz. To samo osiągnięto spryskując liście inhibitorem 10' po zakażeniu. W miarę upływu czasu od chwili zakażenia wpływ inhibitora na WMT maleje. Wykazano, iż czynnik działający na WMT jest odporny na temperaturę 120° przez 15' oraz zmniejsza swą aktywność wskutek dializy. 0,1% roztwór kwasów porostowych otrzymanych metodą Kłosa zmniejsza ilość nekroz czterokrotnie w porównaniu z kontrolą.

Wydaje się prawdopodobne, iż działanie wyciągu z *C. islandica* na WMT pozostaje w związku z obecnością kwasów porostowych.

(Wpłynęło dn. 3.10.1958 r.)

Zakład Fizjologii Roślin U. Ł.

Kierownik: prof. dr W. Moycho

SUMMARY

The action of an extract, from *Cetraria islandica* lichen, on Tobacco Mosaic Virus has been studied. The extract under discussion was produced by means of 24-hours extraction of pulverized lichen with phosphate buffer, of pH ca 8, in room temperature. To determine the activity of TMV on *Nicotiana glutinosa* leaves the method of local lesions was applied.

TMV mixed with the lichen extract shows no activity: on 8 control half-leaves 357 lesions took place and on the experimental ones no one appeared. The initial inhibitor, diluted in proportion 1:500 remarkably restrains the virus activity. When used before infection it shields the plant from local lesions. Just the same effect was achieved by spraying leaves with the inhibitor at ten minutes after infection. In course of time after infection the influence of inhibitor on TMV grows less and less. It was found that the factor acting on TMV is resistant against temperature of 120 centigrades, within 15 minutes, and decreases its activity due to dialize. 0,1% (per cent) solution of lichen acids, received by Cłosa's method, decreases the number of lesions 4 times in comparison with the number in controls.

The action of *Cetraria islandica* extract on TMV is supposedly in connection with the presence of lichen acids in it.

LITERATURA

- Bawden F. C., a. Freeman G. G., 1952, J. Gen. Microbiol. 7: 154.
Grant T., 1934, Phytopath. 24: 311 (cyt. przez Suchow).
Gray R. A., 1955, Phytopath. 45: 281.
Gray R. A., 1957, Plant Dis. Repr. 41: 576.
Kutsky R. J., a. Rawlins T. E., 1950, J. Bact. 60, 763.
Kutsky R. J., 1952, Science 115: 19.
Kassanis B., a. Bawden F. C., 1954, J. Gen. Microbiol. 10: 160.
Kassanis B., a. Kleczkowski A., 1948, J. Gen. Microbiol. 2: 143.
Mathews R. E. F., 1955, Discovery 16: 421.
Mordarski M., 1955, Post. Hig. Med. Dośw. 9: 181.
Porter F. M., Smale B. C., Preston W. H. a. Mitchell J. W., 1957, Phytopath. 47: 3.
Price W. T. a. Gupta B. M., 1950, Phytopath. 40: 23.
Slagle C. W., Wolcyz S. a. Price W. C., 1954, Phytopath. 42: 240.
Suchow K. S., 1956, Wirusy, Moskwa.
Takahashi W., 1948, Science 107.
Tokuzo Hirai, Toru Shimomura, Yonosuke Nishikawa, 1958, Nature 181: 352.

*

Dalsze badania wykazały obecność inhibitorów WMT również w innych porostach (*Evernia prunastri*, *Xantoria parietina*, *Parmelia furfuracea*, *Parmelia phytodes*, *Ramalina* sp.). Materiały te zostaną opublikowane później.