Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej z kosarzy (*Phalangium opilio* L.)

Tobacco mosaic virus inhibitor in Phalangium opilio L.

M. GUBAŃSKI

Znane są obecnie liczne związki wpływające hamująco na reprodukcję i infekcję wirusów. Niektóre z nich posiadają budowę zbliżoną do normalnych składników wirusowych i działają na zasadzie antymetabolizmu; do związków tych należą różne pochodne puryn i pirymidyn oraz aminokwasów (Mathews, Smith 1955). Antymetabolity te hamują zarówno reprodukcję wirusów roślinnych, jak i zwierzęcych.

Obecność związków antywirusowych wykazano w wielu roślinach, grzybach i porostach (Moycho, Gubański, Rennert 1958), chociaż w większości przypadków nie zostały one zidentyfikowane. Do ciekawszych związków otrzymanych z tych źródeł należą: noformicina — antybiotyk otrzymany z grzyba *Nocardia formica*, trichotecina — produkt życiowej działalności pasożyta roślin *Trichotecium roseum*, związki wysokocząsteczkowe z roślin wyższych i drożdży (Bawden 1954). Wszystkie te związki hamują infekcję lub reprodukcję wirusów poprzez roślinę, najprawdopodobniej w wyniku blokady receptorów wirusowych (Van Kamen, Noordena, Thung 1961).

Inhibitory wirusów występują również w ciele zwierząt oraz w produktach ich życiowej działalności (Hein 1961; Limmasset 1961). Szczególnie silne właściwości antywirusowe wykazuje mleko, dzięki czemu wykorzystywane jest w walce z mozaiką tytoniową na plantacjach pomidorowych (Hein 1961). Interesujące — ze względu na mechanizm działania — związki anty-WMT stwierdzono ostatnio w zwierzętach wodnych (Limmasset 1961). Należy jednak stwierdzić, że o ile rośliny były z tego punktu widzenia przedmiotem systematycznych badań, o tyle zwierzęta — sporadycznych.

Jak wskazują wstępne badania własne, częstotliwość występowania inhibitorów w zwierzętach niższych jest podobna do częstotliwości występowania w grzybach.

W pracy niniejszej przedstawione są wyniki badań wskazujące na obecność oraz na pewne własności i mechanizm działania inhibitorów wirusa mozaiki tytoniowej z kosarzy; tego typu własności kosarzy — o ile wiadomo autorowi — nie były dotąd notowane w literaturze.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Wirus mozaiki tytoniowej. Do doświadczeń używano wyłącznie odpowiednio rozcieńczonego preparatu czystego wirusa, otrzymywanego z tytoniu mozaikowatego metodą opisaną przez Schneidera; zamiast jednak ultrawirowania wytrącanie przeprowadzano za pomocą siarczanu amonu wg Bawdena (Gubański 1961).

Rośliny doświadczalne. Rośliną doświadczalną było *Nicotiana glutinosa*, która była hodowana w szklarni w skrzynkach, po 6 roślin w każdej. Zakażane rośliny miały po 6 dobrze rozwiniętych liści.

Zakażanie. Liście posypywano karborundem, a następnie inokulowano roztworem wirusa (kontrola) lub mieszaniną wirusa z ekstraktem kosarzy. Zabieg ten wykonywano tamponikiem gazy. Po upływie 3—5 dni na liściach pojawiały się nekrotyczne plamki, których ilość była proporcjonalna do stężenia wirusa.

Preparaty na liściach rozmieszczano wg kwadratu łacińskiego.

Kosarze. Schwytane kosarze konserwowano w 96% alkoholu; po wysuszeniu w temperaturze pokojowej rozcierano je na proszek. Tak przygotowany materiał zalewano na okres 18 godz. buforem fosforanowym 1/15 M lub wodą destylowaną, w stosunku 1 kosarz — 1 ml płynu. Po upływie tego czasu wyciąg sączono i klarowny płyn brano do dalszych badań.

Ekstrakcję przeprowadzano w lodówce.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

W doświadczeniach wstępnych, w ślad za innymi eksperymentatorami, wyciąg mieszano z wirusem, a następnie wcierano w górną powierzchnię blaszki liściowej *N. glutinosa*. Kontrolą był wirus o takim samym rozcieńczeniu.

Z danych umieszczonych w tabeli 1 widać, że wyciągi z kosarzy i to zarówno buforowe, jak i wodne posiadają silne własności antywirusowe. Ekstrakty te zmniejszają liczbę nekroz co najmniej 20-krotnie, a po 10-krotnym rozcieńczeniu jeszcze 6—7 razy w porównaniu z kontrolą.

Skojarzenie powyższych danych ze sposobem przyrządzania wyciągów (10 kosarzy, których powietrznie sucha masa wynosi 80 mg, w 10 ml płynu) pozwala wnosić, że stężenie czynnych substancji jest tu małe.

Stwierdzenie inhibitorów wyżej opisanym sposobem nie pozwala wnosić nic o mechanizmie ich działania, bowiem efekt zmniejszania się liczby nekroz może być wynikiem inaktywacji wirusa *in vitro*, jak i skutkiem działania na roślinę. W ostatnim przypadku hamowanie może być rezultatem blokowania receptorów wirusowych, bądź też skutkiem działania na procesy prowadzące do syntezy wirusa. Dla odróżniania inaktywatorów od inhibitorów opisano wiele sposobów, z których kilka wykorzystano w niniejszej pracy.

T a b e l a 1 - T a b l e 1

Wpływ wodnych i buforowych ekstraktów z kosarza na reakcję nekrotyczną wirusa mozaiki tytoniowej na liściach *N. glutinosa*

Effect of aqueus and buffer extracts of *Phalangium opilio* L. on lesion production by tobacco mosaic virus

Wyciąg Extract	Liczba nekroz na 6 liściach Number of lesions on 6 leaves		
	Kontrola Control	Wyciąg +WMT Extract +TMV	Wyciąg rozcieńczony 10X +WMT Extract diluted 1:10 +TMV
Buforowy Buffer	717	27	-
Wodny Aqueous	620	29	110

Inhibitory, w przeciwieństwie do inaktywatorów, działają natychmiastowo (czas preinkubacji nie ma wpływu na końcowy efekt), hamują reakcję nekrotyczną na liściach zakażonych od strony górnej — potraktowanych od strony dolnej lub po tej samej stronie liścia, lecz po upływie pewnego czasu.

Z tabeli 2 widać, że liście potraktowane wyciągiem z kosarzy od strony dolnej — lub po 30 min. od zakażenia wirusem — mają mniejszą o połowę liczbę nekroz niż kontrola. Można stąd wnosić, że występujące tu anty-WMT związki działają raczej poprzez roślinę, a nie bezpośrednio na wirusa. Jak wiadomo, proces infekcji dokonuje się w pierwszych pięciu minutach po inokulacji, dlatego traktowanie po 30 min. od tego zabiegu wyklucza działanie na cząsteczkę wirusa. To samo dotyczy liści potraktowanych wyciągiem od strony dolnej. To ostatnie doświadczenie wskazuje również na zdolność migrowania inhibitora poprzez komórki liściowe do miejsc reprodukcji wirusa.

Jak już zaznaczono wyżej, do inaktywacji wirusa niezbędny jest dłuższy okres preinkubacji, dlatego inokulując roślinę mieszaniną wirusa z odpowiednim czynnikiem, sporządzoną tuż przed samym zabiegiem oraz wcześniej, można odróżnić inaktywatory od inhibitorów.

W tabeli 3 podane są wyniki doświadczeń, w których porównywano działanie wyciągu zmieszanego z WMT 2 godz. przed inkulacją na *N. glutinosa* oraz zmieszanego tuż przed samym zabiegiem. Liczba nekroz w obu przypadkach jest podobna, tzn. kilkanaście razy mniejsza niż

T a b e l a 2 - T a b l e 2

Hamowanie powstawania nekroz przez wyciągi z kosarza na liściach potraktowanych od strony dolnej oraz po upływie 30 min. od zakażenia
 Inhibition of lesions production of TMV by extracts from *Phalangium opilio* L. when applied to under surface of leaves and after infection

Liczba nekroz na 6 liściach <i>N.glutinosa</i> Number of local lesions on 6 leaves of <i>N.glutinosa</i>			
Kontrola Control	Ekstrakt +WMT Extract +TMV	Dolna strona liścia spryskana ekstraktem Lower surface of leaves sprayed with extract	Liście spryskane 30 min. po zakażeniu Leaves sprayed with extract after infection
468	18	207	-
613	9	-	279

w kontroli. Doświadczenie to potwierdza wyżej sformułowany wniosek dotyczący mechanizmu działania wyciągu kosarzy na WMT.

Niewątpliwie, przytoczone doświadczenia dają tylko ogólne wyobrażenie o sposobie działania występujących tu związków, nie wnikają natomiast w istotę mechanizmu. Tego typu badania będzie jednak można podjąć dopiero z czystym związkiem, po wyodrębnieniu i zidentyfikowaniu inhibitora kosarza.

T a b e l a 3 - T a b l e 3

Wpływ długości okresu preinkubacji wyciągu z kosarza z WMT na powstawanie nekroz na liściach *N.glutinosa*
 Instantaneous effect of *Phalangium opilio* L.extract in inhibiting lesion production by TMV on *N.glutinosa*

Liczba nekroz na 6 liściach Number of local lesions on 6 leaves		
Kontrola Control	Liście zakażano natychmiast po zmieszaniu Leaves inoculated immediately after mixing	Liście zakażano 3 godz. po zmieszaniu Leaves inoculated 3 hrs after mixing
468	22	28

T a b e l a 4 - T a b l e 4

Wpływ dializy, alkoholu etylowego oraz temperatury 100 °C na aktywność
inhibitora WMT z kosarza

The effect of dialise, ethyl alcohol and temperature 100 °C on the acti-
vity of *Phalangium opilio* L. inhibitor

Liczba nekroz na 6 liściach *N.glutinosa*
Number of lesions on 6 leaves of *N.glutinosa*

Kontrola Control	Ekstrakt +WMT Extract +TMV	Ekstrakt dializowany +TMV Dialised extract +TMV	Ekstrakt podgrzany w 100° +WMT** Heated extract +TMV**	Ekstrakt wytrącony alkoholem +WMT* Extract precipitated in alcohol +TMV*
513	5	-	10	-
190	17	35	-	40

* 2 ml wyciągu wytrącano 2 objętościami alkoholu etylowego, odwirowy-
wano i osad bez suszenia resuspendowano w wodzie.

2 cc of extract were precipitated in 2 volumes of alcohol, centrifuged
and the fresh precipitate was resuspended in water.

** Wyciąg podgrzewano przez 15 min. na wrzącej łaźni wodnej, po ozię-
bieniu sączono.

The extract was heated for 15 minutes in boiling water and filtered
after cooling.

Z dalszych doświadczeń, które ilustruje tabela 4, wynika, że inhibitor
kosarza jest termostabilny — nie ulega inaktywacji w czasie 15-min.
podgrzewania w łaźni wodnej w 100°, nie przechodzi przez worek dia-
lizacyjny (dializowano 3 dni w temp 4°, w tym 2 dni wobec wody de-
tylowanej i 1 dzień wobec wody z kranu) oraz wytrąca się 3 objętościami
alkoholu etylowego. Doświadczenia te nasuwają myśl, że czynny związek
ma naturę wielkocząsteczkową.

DYSKUSJA

Przy poszukiwaniu inhibitorów stosuje się różne fitowirusy oraz
różne rośliny testowe, chociaż najczęściej używany jest WMT i roślina
N. glutinosa reagująca na infekcję nekrozami miejscowymi. Wartość
uzyskiwanych na tej drodze wyników jest względna, bowiem związki
wstrzymujące reakcję nekrotyczną często nie wpływają na reprodukcję
wirusa w roślinie dającej zakażenie ogólne. Jak już wspomniano w in-
nym rozdziale, hamowanie zmian miejscowych może być wynikiem

inaktywacji wirusa, blokowania receptorów bądź też zmian w procesach fizjologicznych komórki. Z tych względów wysuwa się różne zastrzeżenia pod adresem tej metody. Mimo to jednak, przy masowych poszukiwaniach środków antywirusowych, jest ona wyjątkowo cenna, głównie z powodu szybkości uzyskiwania wyników i prostoty zabiegów.

Co do inhibitora WMT, stwierdzonego w kosarzu, należy przypuszczać, że jest on aktywny jeszcze przy dużych rozcieńczeniach, na co wskazuje następujące rozumowanie. Ekstrakty sporządzano z 10 kosarzy o powietrznie suchej masie 80 mg w 10 ml płynu; w czasie sączenia zasadnicza masa pozostawała na sączku. Tak przyrządzony wyciąg po 10-krotnym rozcieńczeniu zmieszany z wirusem mozaiki tytoniowej w stosunku 1:1 zmniejsza liczbę nekroz (w porównaniu z kontrolą) jeszcze 6 razy; na liściach kontrolnych powstało nekroz 620, a w obecności wyciągu 110.

Należy jednak podkreślić, że w żadnym z doświadczeń, bez względu na stężenie wyciągu (największe stężenie: 1 kosarz na 1 ml), nie uzyskano zupełnego zahamowania reakcji nekrotycznej; jeżeli nawet zdarzyło się to na jednym liściu, to na drugim było już kilka nekroz. Najwidoczniej pozostaje to w związku z fizjologicznym stanem liści (czy też roślin), bowiem każdy z nich reprezentuje inną roślinę oraz inny liść ze względu na wiek. Brak zupełnego hamowania reakcji nekrotycznej przez inhibitory odnotowali również inni badacze. Bawden i Freeman tłumaczą to zjawisko brakiem stechiometrycznych zależności między stężeniem wirusa oraz inhibitora.

Ze względu na mechanizm działania, związki kosarza można zakwalifikować do inhibitorów działających poprzez roślinę.

Natura tych inhibitorów nie została na razie zidentyfikowana, chociaż wstępne próby wskazują, że należą one do związków wielkocząsteczkowych, albowiem nie przechodzą przez błony celofanowe oraz wytrącają się alkoholem.

Na marginesie niniejszej pracy pragnę wyrazić refleksje o charakterze ogólniejszym, które mogą mieć pewne znaczenie taktyczne przy poszukiwaniu środków antywirusowych w ogóle. Mianowicie, przy poszukiwaniu tego typu związków za mało uwagi zwraca się na zwierzęta, szczególnie niższe (owady, pająki, mięczaki itd.), które, jak sygnalizują sporadyczne doniesienia — są z tego punktu widzenia materiałem bardzo obiecującym. Metabolizm ich jest nie mniej urozmaicony niż grzybów — głównych dostarczczyeli antybiotyków — dlatego można tu spodziewać się różnorodnych związków, a w ich liczbie również związków o własnościach antywirusowych.

Na zakończenie składam serdeczne podziękowanie drowi F. Wojtasowi za bezinteresowną pomoc w oznaczaniu pajaków.

STRESZCZENIE

Stosując roślinę testową *Nicotiana glutinosa* w wyciągach kosarzy stwierdzono silny inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej. Związek ten eluuje się wodą i buforem fosforanowym. Zdolność hamowania reakcji nekrotycznej zachowuje się w ekstraktach podgrzewanych na wrzącej łaźni wodnej przez 15 min. oraz dializowanych przez 4 dni w temp. 4°.

Hamowanie reakcji nekrotycznej jest wynikiem działania na roślinę, a nie na cząstkę wirusa — bowiem: a) stopień hamowania nekroz nie zależy od czasu preinkubacji wyciągu z wirusem, b) hamowanie nekroz ma miejsce na liściach potraktowanych inhibitorem od strony dolnej oraz po 30 min. od zakażenia rośliny.

SUMMARY

Strong inhibitor of TMV was found in *Phalangium opilio* L.

The test plant in the experiments was *Nicotiana glutinosa*.

Respective antiviral properties show buffer, aqueous extracts; the power to inhibit necrotic reactions remains in heated extracts at 100°C for 15 minutes and in dialysed for 3 days at 4°C.

The inhibition of necrotic reaction results from action on the plant and not on the virus particle because, a) the degree of necrotic inhibition does not depend on the time of preincubation of the extract containing virus, b) the necrotic inhibition takes place on leaves treated on bottom side and 30 minutes after infection.

LITERATURA

- Bawden F. C., 1954, Inhibitors and plant viruses, *Advances in Virus Research* 2: 31
- Bawden F. C. a. Freeman G. G., 1952, The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by *Trichothecium roseum* Link., *J. Gen. Microb.* 154: 7.
- Gubański M., 1961, Metody hodowli i ilościowych oznaczeń WMT, *Wiadomości Botaniczne* 5: 17.
- Hein A., 1961, Untersuchungen mit einem virushemmstoff aus hefeextrakt, *Phytophyth.* 41: 234.
- Van Kammen A., Noordam D., Thing T. H. 1961, The mechanism of inhibition with tobacco mosaic virus by an inhibitor from carnation sa, *Virology* 14: 100.
- Limasset P., 1961, Observations preliminaires demonstrent l'existence de la mosaïque du tabac chez des animaux aquatiques la plupart marins, *C.r.Acad. Sci.* 252: 20.
- Mathews R. E. F., Smith J. D., 1955, The chemotherapy of viruses, *Advances in Virus Research* 3: 49.
- Moycho W., Gubański M., Rennert A., 1959, Wyciąg z porostu *Cetraria islandica* inhibitorem WMT, *Acta Soc. Bot. Pol.* 28: 185.