Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej ze sporyszu (*Claviceps purpurea*)

A tobacco mosaic virus inhibitor from ergot (Claviceps purpurea T.)

M. GUBAŃSKI

Inhibitory wirusów roślinnych są interesujące zarówno ze względów praktycznych, jak i teoretycznych (Bawden, 1954; Horsfall, 1959).

Badania, z zastosowaniem tego typu związków, dostarczyły wielu cennych informacji o mechanizmie powielania zakaźnych nukleoproteidów; wiele światła na to zagadnienie rzucają doświadczenia z antymetabolitami puryn i pirymidyn (Bawden 1954; Horsfall 1959).

Inhibitory są potencjalnymi środkami antywirusowymi. Doświadczenia lat ostatnich wskazują na możliwość praktycznego ich wykorzystania w walce z chorobami wirusowymi. Tak np. mleko oraz produkty mleczne można z powodzeniem stosować w walce z mozaiką tytoniową oraz innymi chorobami wirusowymi na plantacjach roślin uprawnych (Hageborg and Chelack 1960).

Należy jednak podkreślić, że dotychczas niewiele przebadano organizmów pod kątem występowania w nich inhibitorów wirusowych, a tylko nieliczne doczekały się szczegółowego opracowania (Bawden; Freeman, 1952).

Spśród kilkudziesięciu gatunków zwierząt i roślin, przebadanych przez autora niniejszej pracy, kilka zawiera bardzo silne inhibitory wirusa mozaiki tytoniowej (Gubański, 1963a; 1963b; Moycho i wsp., 1960). Do tych „kilku” należy także sporysz. Chociaż materiał ten jest znany od dawna jako źródło związków leczniczych, to jednak w literaturze nie ma danych o jego własnościach antywirusowych.

MATERIAŁ I METODY

Wirus mozaiki tytoniowej (WMT), użyty do doświadczeń, otrzymano z tytoniu na drodze wysalania siarczanem amonu. Większe ilości wirusa przechowywano w roztworze półnasyconego siarczanu amonu; przed doświadczeniami pobierano część osadu, odwirowywano, płyn wylewano, a osad rozpuszczano w buforze fosforanowym o pH = 7,3 i poddawano trzydniowej dializie. Tak przygotowanego wirusa używano w doświadczeniach na infekcyjność.

Wszystkie doświadczenia wykonywano na roślinach *Nicotiana glutinosa*. Roślinę tę hodowano w szklarni, w skrzynkach z glebą (po 6 roślin w jednej skrzynce). Wirusa szczepiono wtedy, gdy rośliny miały 6 dobrze rozwiniętych liści, poszczególne próbki na liściach rozmieszczano wg kwadratu łacińskiego.

Roztwór wirusa wcierano tamponikiem gazy w powierzchnię liści posypanych karborundem. Po upływie 3—4 dni, w zależności od pory roku, pojawiają się nekrozy, których ilość jest miarą infekcyjności próbki.

Metody hydrolizy ilościowego oznaczania oraz metody identyfikacji cukrów podano w innej pracy (G u b a ń s k i, 1964), dlatego tutaj zrezygnowano z ich opisu.

Sporysz (*Claviceps purpurea*), stosowany w niniejszej pracy, częściowo zebrano na plantacjach żyta (okolice Łodzi), częściowo zaś otrzymano z Zakładów Zielarskich „Herbapol”.

Do frakcjonowania wyciągów stosowano wyłącznie alkohol skażony benzenem albo metanolem.

Pozostałe odczynniki: butanol, fenol, kwas octowy, chlorek sodu i inne pochodziły z Hurtowni Odczynników Chemicznych w Łodzi i posiadały znak czystości: ch. cz.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Inhibitorowe własności wyciągów ze sporyszu

We wstępnych doświadczeniach wyciąg sporządzano następująco: do 5 różków sporyszu, roztartych na proszek, dodawano 10 ml wody, albo buforu fosforanowego o pH 7,3, lub 50% etanolu. Mieszaninę wstawiano

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

Wpływ wodnych, etanolowych i buforowych wyciągów ze sporyszu na powstawanie nekroz WMT na liściach *Nicotiana glutinosa*

Effects of aqueous, buffer and etanol extracts of ergot on lesion production by TMV on *N. glutinosa*

Liście zakażano WMT z dodatkiem: Leaves was infected by TMV with addition:	Liczba nekroz na jednym liście Number of lesions per one leaf	
	kontrola control	ekstrakt extract
Wyciągu wodnego Aqueous extract	78	0
Wyciągu buforowego Buffer extract	48	5
Wyciągu etanolowego Etanol extract	21	1

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

Hamowanie powstawania nekroz WMT na liściach *N. glutinosa* w zależności od czasu preinkubacji WMT z wyciągiem oraz sposobu potraktowania liści

Effect of ergot extract on lesion production by TMV on leaves of *N. glutinosa* in relation to preincubation time and method of application

Liście zakażano Leaves was inoculated	Liczba nekroz na sześciu liściach Number of local lesions on six leaves	
	kontrola control	ekstrakt extract
3 godz po zmieszaniu 3 hrs after mixing	236	2
10 min po zmieszaniu 10 min after mixing	260	2
Dolna strona liścia spryskana inhibitorem Lower surfaces of leaves sprayed with extract	265 278 *	90 300 *

* Wyciąg ze sporyszu otrzymanego z Zakładów Zielarskich "Herbapol".
Extract from "Herbapol" ergot.

do lodówki na 24 godziny i następnie sączone, a przesącz badano na obecność inhibitorów. Ekstrakty alkoholowe odparowywano do suchości, a pozostałość eluowano wodą. 2 ml tak sporządzonych ekstraktów mieszano z WMT w stosunku 1:1 i wcierano w powierzchnię blaszki liściowej *N. glutinosa*. Z danych umieszczonych w tabeli 1 widać, że bez względu na sposób przyrządzania ekstraktów, zawierają one związki hamujące powstawanie nekroz WMT.

Liczby podane w tabeli 2 pozwalają wnosić, że obecne w ekstraktach sporyszu związki nie inaktywują WMT, lecz wpływają na proces infekcji, ponieważ hamują nekrozy zarówno wtedy, gdy są dodane do roztworu wirusa 3 godziny przed inokulacją rośliny, jak i tuż przed samym zabiegiem (Crowley, 1955).

IZOLOWANIE INHIBITORA

Izolowanie inhibitora WMT ze sporyszu przeprowadzano dwiema metodami: 1) chromatograficzną oraz 2) wytrącania alkoholem etylowym. Preparaty uzyskiwane tak różnymi metodami są podobne, tak pod względem pewnych własności chemicznych, jak i aktywności antywirusowej.

1. Izolowanie inhibitora na drodze chromatograficznej

50 g sproszkowanego sporyszu zalewano 20 ml wody destylowanej, mieszano i podgrzewano do 50°. Po jednogodzinnym wytrząsaniu, mieszaninę sączone najpierw z pomocą pompy próżniowej, następnie na

zwykłym lejeku. Otrzymany ekstrakt podgęszczano do małej objętości przez odparowywanie na promienniku podczerwieni. Odparowywanie przyspieszano wiatraczkiem; zabieg ten chronił dodatkowo płyn przed przegrzewaniem. Jeżeli w czasie podgęszczania wytrącał się osad, to usuwano go na drodze wirowania. Tak sporządzony ekstrakt, mający konsystencję syropu, wykazywał silne działanie antywirusowe, był używany do chromatografii.

Wzdłuż dolnego marginesu rozpołowionego arkusza bibuły Whatmann 3MM nakładano podgęszczony wyciąg w postaci linii ciągłej. Po nałożeniu, bez suszenia, chromatogram wstawiano do kamery i rozwijano (techniką wstępującą) w 3% NaCl. Czas rozwijania wynosił około 1 godziny; w okresie tym czoło rozwijacza przebywa drogę 20 cm.

Na wysuszonej bibule (temp. pokojowa) w ultrafiolecie dostrzega się kilka smug, odpowiadających różnym grupom związków, fluoryzujących różnymi odcieniami barwy, bądź też absorbujących światło UV. Kierując się tymi danymi, bez wnikanania w naturę uwidacznianych związków, chromatogram cięto na 5 poprzecznych pasków, które eluowano wodą. Eluaty, po doprowadzeniu do jednakowej objętości, badano na obecność inhibitorów WMT.

Jako zasadę przyjęto następującą numerację pasków bibuły: odcinek przylegający do czoła rozwijacza (4 cm) odpowiada numerowi 5, niżej

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

Położenie inhibitora WMT na chromatogramach w zależności od stosowanego rozwijacza

Position of TMV inhibitor on chromatograms in relation to the developer used

		Liczba nekroz na jednym liście N.glutinosa* Number of lesions per 1 leaf of N.glutinosa			
Frakcja Fraction	Rozwijacz Developer	3% NaCl	80% etanol	80% fenol	80% fenol 80% etanol
Kontrola Control		63	30	31	112
5**		1	26	16	96
4		21	23	18	110
3		56	36	20	85
2		48	28	21	75
1		63	1	0,3	9

* 2 ml eluatu z odpowiedniej części chromatogramu mieszano z 2 ml WMT i wlecano w liście N.glutinosa.

2 cc of extract from an appropriate part of chromatogram were added to 2 cc of TMV and solution thus obtained rubbed into N.glutinosa leaves.

** Cyfry od 5-1 oznaczają kolejne poprzeczne odcinki chromatogramu: 1 - odpowiada strefie przylegającej oraz obejmującej linię startową, 5 - część chromatogramu przylegającą do czoła rozwijacza.

Figures from 5 to 1 denote successive cross sections from paper chromatograms: 1 - close and including the starting line, 5 - part of chromatogram close to the head of developer.

leżący czterocentymetrowy odcinek — numerowi 4 itd., zaś fragment bibuły leżący przy linii startowej wraz z nią — 1.

Z odpowiedniej rubryki w tabeli 3 widać, że związki hamujące nekrozy WMT zlokalizowane są (przy zastosowaniu 3% NaCl jako rozwijacza) na odcinku — 5. Znajdujące się tu związki silnie fluoryzują w UF; od niżej leżących oddzielone są linią falistą; z ninhydryną oraz ftalanem aniliny dają reakcje dodatnie. Można stąd wnosić, że frakcja ta zawiera, między innymi, aminokwasy i cukry. Z tego względu dalsze frakcjonowanie przeprowadzano z zastosowaniem rozpuszczalników używanych do rozdzielania aminokwasów i cukrów.

Eluat z odcinka 5 podgęszczano, nakładano na chromatogram i rozwijano w 80% etanolu, fenolu. Podobnie jak poprzednio, rozwijanie trwało tak długo, aż rozwijacz przebył drogę 20 cm. Po rozwinięciu chromatogramy cięto na paski i badano na aktywność antywirusową. Z liczb w tabeli 3 można wnosić, że w przeciwieństwie do rozwijacza poprzedniego, w rozwijaczach organicznych inhibitory zlokalizowane są na odcinku bibuły przylegającej oraz obejmującej linię startową. Pozostałe odcinki nie wpływają na nekrozy, dlatego nie zwracano na nie dalej uwagi.

Odcinek 1, podobnie jak 2—4, daje dodatnią reakcję z ninhydryną, lecz ujemną z ftalanem aniliny; odpowiednie smugi barwne przylegają ściśle do siebie, chociaż różnią się znacznie odcieniem barwy.

Celem lepszego rozdzielania związków, ekstrakt z odcinka 1 chromatogramu rozwiniętego w etanolu 80%, rozwijano w fenolu, etanolu oraz

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

Lokalizacja inhibitora WMT na linii startowej oraz strefie do niej przylegającej
Localization of TMV inhibitor on the starting line of chromatograms and the near zone

Liczba nekroz na jednym liście Number of lesions on 1 leaf					
Nr No.	Strefa Near	Rozwijacz Developer	80% etanol	80% fenol	80% fenol 80% etanol
0	kontrola control		24	22	79
1	linia startowa starting line		0,8	0	1,5
2	1 cm wyżej 1 cm above 1		6	4	7
3	1 cm wyżej 2 1 cm above No 2		7	8	19
4	1 cm powyżej 3 1 cm above No 3		13	15	27

Sposób robienia doświadczeń - patrz tabl.3.

For the method description see table 3.

fenolu (pierwsze rozwijanie) i etanolu (drugie rozwijanie) równocześnie, przedłużając czas do kilkunastu godzin. Kilkucentymetrowy odcinek chromatogramu przylegający do linii startowej cięto na paski 1 cm i analizowano na obecność inhibitorów. Za podstawę do podziału na strefy przyjęto reakcję z ninhydriną; występujące tu związki tworzyły dobrze odgraniczone od siebie smugi.

Z tabeli 3 widać, że nawet przy dwukrotnym rozwijaniu chromatogramu, inhibitory pozostają na odcinku przylegającym do linii startowej; dokładniejsza analiza tej strefy wskazuje, że najsilniej nekrozy WMT hamują związki znajdujące się na samej linii startowej, słabiej, chociaż bezspornie, na odcinkach leżących wyżej (tabela 4).

Stosując rozwijanie wyciągu ze sporyszu kolejno w następujących rozwijaczach:

- a) 3% wodny roztwór chlorku sodu,
- b) etanol 80% (frakcja 55 z poprzedniego chromatogramu),
- c) fenol 80% oraz etanol 80% — dwukrotne rozwijanie (odcinek 1 z b),

z 50 g sporyszu uzyskano ca 15 mg preparatu silnie hamującego powstawanie nekroz WMT na liściach *N. glutinosa*; inhibitor nie tracił aktywności przez szereg tygodni.

2. Otrzymywanie inhibitora metodą frakcjonowanego wytrącania etanolem

Do 100 g sproszkowanego sporyszu wlewano 0,5 kg acetonu i podgrzewano na promienniku podczerwieni. Po 30 min. aceton odsączano, sporysz suszono i ponownie eluowano 80% etanolem na ciepło. Frakcję alkoholową odrzucano, a sporysz ekstrahowano na ciepło 2×400 ml wody. Połączone ekstrakty sączono i frakcjonowano etanolem. 1 objętość przesączu mieszano z objętością 96% etanolu, wytrącający się osad odwirowywano i odrzucano. Do 1 objętości klarownego płynu wlewano 1 objętość 96% etanolu, zakwaszono 1 ml lodowatego kwasu octowego i wstawiano na noc do lodówki. Osad oddzielano na drodze wirowania, płyn wylewano.

Dalsze oczyszczanie preparatu polegało na rozpuszczaniu osadu w wodzie, odwirowywaniu nierozpuszczalnych części i frakcjonowanym wytrącaniu alkoholem etylowym jak wyżej. Po trzykrotnym powtórzeniu powyższych operacji, osad przenoszono do naczynka wagowego, zalewano alkoholem i suszono w temperaturze pokojowej. Po pewnym czasie preparat rozpuszczano ponownie w wodzie, nierozpuszczalne części odwirowywano, poddawano wytrącaniu alkoholem i suszono ponownie. Tak otrzymany preparat przechowywano w pokoju i używano do badań.

Schemat izolowania inhibitora ze sporyszu

Ze 100 g sporyszu otrzymano ca 150 mg preparatu, którego zdolność hamowania nekroz jest podobna do tej, jaką wykazuje preparat otrzymany na drodze chromatograficznej.

Czynności wyszczególnione w punktach 4—6 powtarzamy 3 razy, następnie preparat suszymy w temp. pokojowej i powtarzamy oczyszczanie jeszcze raz.

Natura chemiczna inhibitora

Zarówno preparaty otrzymane na drodze wytrącania alkoholem etylowym, jak i chromatograficznie po wyschnięciu dają masę barwy czekoladowej. Preparaty te dobrze rozpuszczają się w wodzie, w słabym kwasie octowym oraz w buforach fosforanowych o różnych pH. Nałożone na bibułę i rozwijane w rozpuszczalnikach organicznych (etanol 80%, fenol 80%) pozostają na starcie.

Miejsce na chromatogramach, zajmowane przez związki hamujące powstawanie nekroz WMT, daje dodatnią reakcję z ninhydryną. Podob-

nie zachowują się preparaty uzyskane na drodze wytrącania etanolem. Reakcja z ninhydryną zachodzi jednak wolniej niż z aminokwasami. Preparaty rozpuszczone w wodzie dają dodatnią reakcję biuretową, lecz ujemną ksantoproteinową i Millona; dane te wskazują, że mamy tu do czynienia z polimerami aminokwasów, najprawdopodobniej białek. Z ilości azotu można wnioskować, że ilość białek wynosi jednak nie więcej niż 30% masy preparatów.

W hydrolizatach preparatu stwierdzono, w przeliczeniu na glikozę, ca 50% cukrów redukujących. Na drodze chromatograficznej i elektroforetycznej cukry te zidentyfikowano jako galaktozę i mannozę. Tak więc drugim składnikiem preparatu jest mannogalakتان.

WSTĘPNE BADANIA NAD MECHANIZMEM DZIAŁANIA INHIBITORA ZE SPORYSZU NA WIRUSA MOZAIKI TYTONIOWEJ

Doświadczenia zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu działania inhibitora ze sporyszu na wirusa mozaiki tytoniowej przeprowadzono wyłącznie z preparatem uzyskanym na drodze frakcjonowanego wytrącania etanolem. Ilość preparatu uzyskiwanego chromatograficznie, niestety, była stanowczo za małą do przeprowadzenia badań bardziej wyczerpujących. Należy jednak podkreślić, że w doświadczeniach, w których używano obu preparatów równocześnie, wyniki były podobne.

Hamowanie nekroz WMT w zależności od pH i stężenia preparatu

Zależność między stężeniem preparatu i ilością nekroz WMT na liściach *N. glutinosa* obrazują wykresy 1A i 1B oraz tabela 5. Z danych tych widać, że przy stężeniu preparatu większym od 0,1 mg/ml roz-

T a b e l a 5 - T a b l e 5

Hamowania nekroz WMT w zależności od stężenia preparatu

Inhibition of TMV lesions in relation to concentration of the preparation

Mieszanina Mixture	Stężenie preparatu Concentration	1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
W wodzie destylowanej In distilled water		$\frac{95}{1}$	$\frac{30}{1}$	$\frac{95}{15}$	$\frac{95}{70}$
W buforze fosforanowym In phosphate buffer		$\frac{74}{1}$	$\frac{80}{1}$	$\frac{74}{15}$	$\frac{74}{52}$

Cyfry w rubrykach oznaczają ilość nekroz przypadającą na jedną połówkę liściową *N. glutinosa*; liczbą w liczniku - ilość nekroz w próbie kontrolnej, mianowniku - w próbie z preparatem.

Figures in the table denote number of lesions on one half-leaf of *N. glutinosa*; in numerator the number of lesions in control, in denominator - with the preparation.

T a b e l a 6 - T a b l e 6

Hamowanie nekroz WMT przez preparat w zależności od pH
Effect of the extract on lesion production by TMV according to pH

Inokulat zawierał bufor o pH pH of the buffer in the inoculum					
H ₂ O	KH ₂ PO ₄	5,6	6,0	6,8	Na ₂ HPO ₄
$\frac{63}{13}$	$\frac{40}{11}$	$\frac{46}{16}$	$\frac{51}{14}$	$\frac{41}{10}$	$\frac{57}{10}$

Inokulat sporządzano następująco: do 1 ml wirusa dodawano 1 ml buforu o określonym pH i 1 ml wody, lub preparatu o stężeniu 0,3 mg/ml.

Cyfrы w liczniku oznaczają liczbę nekroz w kontroli, w mianowniku - w próbie z preparatem o tym samym pH.

The inoculum was being prepared in the following way: 1 cc of the virus solution, 1 cc of buffer pH of which was determined and 1 cc of water or a 0,3 mg/cc preparation were mixed together.

Figures in the numerator denote the number of lesions in the control, figures in the denominator denote the number of lesions in the test with preparation with the same pH.

tworu wirusa liczba nekroz jest znikoma w porównaniu z ilością nekroz w kontroli. Przy stężeniach mniejszych inhibicja nekroz jest słabsza, lecz jeszcze uchwytana.

Hamowanie powstawania nekroz badano dwójako: sporządzając roztwory wirus-inhibitor w wodzie oraz buforach fosforanowych o różnych pH.

Z tabeli 6 widać, że niezależnie od kwasowości wciieranej w liście mieszaniny redukcja nekroz, przy danym stężeniu inhibitora, jest jednakowa. Należy zauważyć, że stężenie preparatu w tych doświadczeniach było małe, dzięki czemu można by było uchwycić ewentualne

Wykres 1. Hamowanie nekroz WMT na liściach *Nicotiana glutinosa* (% w stosunku do kontroli) w zależności od stężenia preparatu w inokulacie (w mg/ml). A — inokulat w wodzie; B — inokulat w buforze fosforowym o pH 6,8

Inhibition of lesions of TMV (in relation to the control) by ergot inhibitor due to their concentration (in mg/ml). A — aqueous extract; B — buffer extract, pH 6.8.

różnice w infekcyjności poszczególnych próbek. Znamienne są, z rozpatrywanego punktu widzenia, wykresy 1A i B; inokulat do wykresu 1A sporządzony był w wodzie, natomiast 1B — w buforze fosforanowym o pH 6,8. Mimo tych różnic krzywe hamowania mają taki sam przebieg.

Doświadczenia powyższe pozwalają na wysunięcie następującego wniosku: hamowanie nekroz WMT na liściach *N. glutinosa* przez inhibitor ze sporyszu nie zależy od pH, a jedynie od koncentracji preparatu.

Wpływ preparatu na WMT in vitro

Zarówno surowe wyciągi, jak i preparaty ze sporyszu (*Claviceps purpurea* T.), w pewnych warunkach wytrącają WMT z roztworów, co objawia się mętnieniem płynu. Preparaty, w przeciwieństwie do wyciągów, powodują krystalizację WMT w postaci pięknych igiełek, widocznych przy małych powiększeniach w mikroskopie. Na powstawanie tych parakryształów wpływa pH oraz stężenie preparatu.

Przy koncentracji preparatu 1—2 mg/ml roztworu wirusa powstają kryształy, które dają się odwirować na zwykłej wirówce laboratoryjnej, po przemyciu zaś rozpuszczają się słabo w wodzie i dobrze w buforze fosforanowym. Wirus taki zaszczepiony na liściach *N. glutinosa* daje ilość nekroz taką samą, jak kontrolny; tak więc preparaty ze sporyszu nie inaktywują WMT (tabl. 7).

Przy koncentracjach preparatu 0,2—0,1 mg/ml zachodzi także agregacja pałeczek wirusowych, bowiem mętnieniu płynu towarzyszą charakterystyczne jedwabisto-metaliczne połyski. Przy koncentracjach mniejszych — mętnienia nie dostrzega się.

Tabela 7 - Table 7

Infekcyjność parakryształów WMT powstałych pod wpływem preparatu o stęż. 2 mg/ml
Infectivity of TMV paracrystals formed with 2 mg/ml preparation

Liczba nekroz na I połowie N.glutinosa Number of lesions on a half-leaf		
Wyjściowy roztwór WMT Initial TMV solution	WMT wytrącony i pozostawiony w lodówce przez 2 dni TMV precipitated and stored in refrigerator for 2 days	WMT wytrącony i odwirowany po 30 min. TMV precipitated and centrifuged after 30 min.
44	42	41

Wytrącone parakryształy odwirowywano, przemycano wodą destylowaną i rozpuszczano w 1 ml buforu fosforanowego, a po dodaniu 1 ml wody szczepiono na liściach *N. glutinosa*; próba kontrolna zawierała 1 ml wirusa i 1 ml buforu.

The precipitated paracrystals were centrifuged, rinsed with distilled water and diluted in 2 cc of water, it was used for inoculation of test plant. The control contained 1 cc of virus and 1 cc of buffer.

Tabela 8 - Table 8

Wytrącanie WMT przez preparat w zależności od jego koncentracji
 TMV precipitation by preparation according to its concentration

Stężenie preparatu w mg/ml roztworu wirusa Concentration of the preparation in mg/cc of the virus solution					
2 mg	1 mg	0,5 mg	0,2 mg	0,1 mg	0,01 mg
+	+	+	±	-	-

+ oznacza mętność roztworu dostrzegalną wzrokowo, - brak mętności.
 + means turbidity of the solution visually perceptible, - no turbidity.

Parakryształy powstają tylko w wodzie destylowanej oraz roztworze KH_2PO_4 . Przy wyższych pH, jak na to wskazują dane w tabeli 9, krystalizacja nie zachodzi.

Agregacja pałeczek wirusowych w większe aglomeraty mogłaby tłumaczyć, przynajmniej częściowo, obniżanie się infekcyjności WMT; porównując tabelę 8, w której podano zależność między koncentracją preparatu i mętnością wirusa, z wykresem 1a dostrzega się wyraźną zbieżność; stężenia preparatu wytrącające go z roztworu silnie hamują powstawanie nekroz. Zestawiając jednak tabelę 6 i 9 ze sobą, prawidłowości takiej już się nie obserwuje. Tak więc związek obserwowanego zja-

Tabela 9 - Table 9

Wytrącanie WMT przez preparat w zależności od pH*
 TMV precipitation by preparation in relation to pH*

Kwasowość mieszaniny wirus-inhibitor Acidity of the mixture virus-preparation					
H_2O	KH_2PO_4	5,8	6,0	6,8	Na_2HPO_4
++	+	±	-	-	-

+ , - oznaczają, podobnie jak w tablicy poprzedniej, mętność względnie jej brak.
 + , - denote, like in the former table, turbidity or its absence.

* Stężenie preparatu w mieszaninie wynosiło 1 mg/ml.
 Concentration of preparation was 1 mg/cc.

wiska — krystalizacja wirusa z inhibitorowymi własnościami preparatów sporyszu wymaga dalszych badań. Nie jest wykluczone, że zjawisko to nie pozostaje w związku przyczynowym z hamowaniem nekroz.

Hamowanie nekroz w zależności od sposobu potraktowania liści preparatem oraz rozcieńczenia mieszaniny wirus—preparat

Inhibitor ze sporyszu nie inaktywuje WMT. Za słuszością tego zdania przemawiają również wyniki doświadczeń podane w tabeli 10, a wykonane z inokulatem o pH 6,8. Dla inaktywacji wirusów potrzebny jest

Wykres. 2. Porównanie infekcyjności różnych rozcieńczeń WMT oraz mieszaniny WMT z preparatem

1 — WMT; 2 — WMT + inhibitor

Infectivity of TMV and mixture of TMV — ergot inhibitor according to their dilution.

1 — TMV; 2 — TMV + inhibitor.

dłuższy okres czasu, zaś preparat sporyszowy w takim samym stopniu hamuje nekrozy, jeżeli dodany jest do wirusa tuż przed wtarciem w liście rośliny testowej, jak i kilka godzin wcześniej.

Hamowanie infekcji może polegać na tworzeniu się kompleksów wirusa z inhibitorem. Dla sprawdzenia tej możliwości wykonano doświadczenia, które polegało na wcieraniu w liście różnych rozcieńczeń mieszaniny wirusa z preparatem. Sądzi się bowiem, że w miarę rozcieńczania mieszaniny wirus—inhibitor następuje dysocjacja nieinfekcyjnych kompleksów na wyjściowe składniki, i dzięki temu częściowe przywrócenie infekcyjności (G u b a ń s k i 1963).

Z danych umieszczonych na wykresie 2 widać, że w miarę rozcieńczania roztworu wirusa ilość nekroz powstających na połowie liściowej wyraźnie się zmniejsza, natomiast po rozcieńczeniu mieszaniny wirusa z preparatem — zwiększa.

Wydaje się, że doświadczenie to może częściowo przemawiać za słuszością wysuniętej hipotezy.

Wśród eksperymentatorów istnieje przekonanie, że związki działające poprzez roślinę na wirusa redukcją ilość nekroz nawet wtedy, gdy zastosowane są po upływie dłuższego czasu od zakażenia albo po spryskaniu dolnej strony liścia (C r o w l e y, 1955).

T a b e l a 10 - T a b l e 10

Wpływ czasu stania WMT z preparatem na ilość nekroz

Effect of the length of stay of TMV with the preparation on the number of local lesions

Liczba nekroz na jednej połówce liściowej N.glutinosa
Number of local lesion on half leaves of N.glutinosa

Kontrola Control	Preparat zmieszano z WMT - The preparation was mixed with TMV	
	3 godziny przed inokulacją rośliny 3 hrs before inoculation	tuż przed inokulacją just before inoculation
53	3	4

Stężenie preparatu w inokulacie - 0,3 mg/ml.

The concentration of the preparation in inoculum was 0,3 mg/ml.

T a b e l a 11 - T a b l e 11

Hamowanie nekroz WMT przez preparat w zależności od sposobu potraktowania liści*

Effect of the preparation on lesion production by TMV in relation to method of leaves treatment

Liczba nekroz na jednej połówce liściowej N.glutinosa
Number of lesions on one half-leaf of N.glutinosa

WMT zmieszany z inhibitorem TMV mixed with inhibitor	Liście potraktowane inhibitorem 30 min po zakażeniu Leaves treated with inhibitor 30 min after infection	Liście spryskane inhibitorem od strony dolnej Leaves sprayed with inhibitor on bottom side
$\frac{83}{1,2}$ **	$\frac{90}{32}$	$\frac{46}{47}$

* Stężenie prep. 2 mg/ml.

Prep. concentration 2 mg/cc.

** Patrz objaśnienia do tabl. 5-6.

See explanations to tables 5-6.

Liczby w tabelach 10 i 11 wskazują, że omawiany inhibitor znacznie redukuje ilość nekroz na liściach potraktowanych nim 30 min. po zakażeniu, lecz nie wpływa jeżeli podany jest na dolną stronę liścia. Tak więc hamowanie nekroz WMT może być wynikiem działania inhibitora zarówno na wirusa bezpośrednio, jak i na mechanizm warunkujący jego syntezę.

DYSKUSJA OGÓLNA

Mimo intensywnych poszukiwań, dotychczas nie znaleziono skutecznych związków antywirusowych pośród antybiotyków, produktów życiowej działalności mikroorganizmów; te, które hamują rozwój wirusów w testach laboratoryjnych bądź nie wpływają na wirusy roślin i zwierząt, bądź też dla roślin i zwierząt są toksyczne (W a k s m a n, 1959).

Z tych względów w ogóle powątpiewa się w możliwość znalezienia związków wybiórczo wstrzymujących powielanie zakaźnych nukleoproteidów, nie naruszających metabolizmu gospodarza. Pewne nadzieje wiąże się z interferonem, związkiem o naturze białkowej, produkowanym przez komórki zwierzęce w odpowiedzi na wtargnięcie wirusa (I s a a c s 1959).

Należy jednak podkreślić, że mimo intensywnych poszukiwań związków antywirusowych, przebadano zaledwie część mikroorganizmów, głównie producentów antybiotyków, które stanowią znikomy odsetek ogólnej liczby organizmów. Na uboczu pozostawiono zwierzęta niższe, które z tego punktu widzenia są również obiecujące (G u b a ń s k i, 1963). Do jakiej kategorii związków należy zakwalifikować inhibitora ze sporyszu? Na obecnym etapie badań tego związku trudno dać odpowiedź jednoznaczną. Niewątpliwie znaczna część doświadczeń przemawia za tym, że należy on, wg klasyfikacji B a w d n a (1954), do inhibitorów infekcji, chociaż pewne wyniki pozwalają wnosić, że wpływa na pewne etapy reprodukcji wirusa. Zagadnienie to ostatecznie rozwiążą szczegółowsze badania, doświadczenia oparte na doskonalszych metodach.

Ze sprawą mechanizmu działania inhibitora wiąże się ściśle jego natura chemiczna. Sporysz, jak wiadomo, jest bogatym źródłem alkaloidów o silnym działaniu farmakologicznym. Nasuwa się zatem pytanie: czy związki te pozostają w jakimś stosunku z inhibitorami WMT? Zebrany materiał pozwala dać tu odpowiedź negatywną.

Alkaloidy nierozpuszczalne w wodzie mogą być wykluczone automatycznie, ponieważ inhibitor posiada własności wręcz przeciwne. Alkaloidy rozpuszczalne w wodzie, charakteryzują się swoistą fluorescencją i na chromatogramach zajmują inne miejsce niż inhibitor (Cromwell); wyjątkowo silnie i pięknie fluoryzujące smugi po wyeluowaniu z chromatogramów i zmieszaniu z WMT nie wpływają na jego aktywność. A ponadto: zarówno preparaty alkaloidów farmaceutycznych w tabletkach, jak i w zastrzykach nie wpływają, względnie wpływają słabo, na WMT. Tak więc, jest mało podstaw, by własności aktywirusowych dopatrywać się u alkaloidów sporyszu.

Przedstawione w poprzednich rozdziałach wyniki wskazują, że inhibitor może mieć naturę złożoną, wielkocząsteczkową, a jednym z jego komponentów może być białko albo polipeptyd, a drugim mannogalak-tan. Inhibitor sporyszowy — chociaż nie posiada tych własności, które są pożądane u związków antywirusowych, posiada wiele interesujących własności, na które starano się zwrócić uwagę w poprzednich rozdziałach, dlatego jest godny szczegółowszego przebadania. Wydaje się, że dalsze doświadczenia z tym związkiem mogą rzucić znaczne światło na mechanizm infekcji wirusowej, a być może i powielanie wirusa tuż po wnikięciu do rośliny. Niektóre z tych aspektów są przedmiotem dalszych badań autora.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

W wyciągach przetrwalników sporyszu: wodnych, buforowych i etanolowych stwierdzono obecność silnego inhibitora wirusa mozaiki tytoniowej.

Na drodze chromatograficznej, oraz metodą wytrącania etanolem, otrzymano preparat, zawierający około 30% białka oraz 50% heteropolisacharydów, którego obecność może w zupełności tłumaczyć antywirusowe własności sporyszu.

Inhibitor sporyszu hamuje infekcję WMT oraz częściowo reprodukcję. Przy koncentracji wyższej od 0,2 mg/ml, wytrąca wirusa z roztworu w formie parakryształów. Sam mechanizm hamowania infekcji polega, najprawdopodobniej, na tworzeniu nieinfekcyjnych kompleksów z wirusem albo na hamowaniu wnikania wirusa do komórki.

(Wpłynęło: 15.12.1963)

SUMMARY

In aqueous extracts from ergot, as well as in buffer and 50% ethanol, TMV inhibitor was demonstrated.

By paper chromatography and ethanol fractionation a preparation was obtained the components of which may account for the inhibitive properties of ergot.

The preparation contains 30% of proteins and 50% of galactomannans.

The preparation from ergot inhibits TMV infection and has little effect on reproduction. It is very likely that the mechanism of infection inhibition depends on formation of some noninfective compounds with TMV or inhibition of virus penetration into the cell.

LITERATURA

- Bawden F. C., 1954, Inhibitors and plant viruses, *Advances in Virus Research* 2:31.
- Bawden F. C., Freeman G. G., 1952, The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses, produced by *Trichothecium roseum*, *J. Gen. Microbiol.* 7:154.
- Crowley N. C., 1955, The effect of seed extracts on the infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission, *Aust. Inst. J. Biol. Sci.* 8:56.
- Cromwell B. T., 1955, The alkaloids of ergot, *Modern Methods of Plant Analysis* 4:409, ed.: Springer-Verlag.
- Gubański M., 1963, Inhibitory WMT w pszczołach i produktach pszczelich, *Zeszyty Naukowe UŁ.* 2:93.
- Gubański M., 1963, Inhibitor WMT z kosarzy, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32:427.
- Hageborg W. A., Chelack W. S., 1960, Whey as inhibitor of stripe mosaic of barley, *Canad. J. Botany* 38:111.
- Horsfall F. L., 1959, Inhibition of multiplication, *The Viruses* (red. F. M. Burnet, Stanley W. M. (3:195) wyd.: Acad. Press, New York).
- Isaacs A., 1959, Nature and function of interferon, perspectives in virology (red. Morris Pollard) 2:111, wyd.: Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- Moycho W., Gubański M., Kędziora T., 1960, TMV-inhibitors in Lichens, *Bull. Acad. Poll. Sci., Cl.* 7:1960.