Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej z porostu *Cetraria islandica* L.

A Tobacco Mosaic Virus inhibitor from Cetraria islandica L.

M. GUBAŃSKI

Moycho, Gubański i Rennert (1959) stwierdzili obecność silnych inhibitorów wirusa mozaiki tytoniowej w wyciągach wodnych z porostu *Cetraria islandica* L., a Moycho, Gubański i Kędzióra (1960) obecność tego typu związków w wielu innych porostach. Choć w pracach tych starano się powiązać pewne związki — głównie kwasy porostowe — z antywirusową aktywnością wyciągów porostowych, to jednak nie przeprowadzono badań systematycznych, badań, które z tego punktu widzenia nie budziłyby wątpliwości.

Z przedstawionych niżej doświadczeń można wnosić, że chociaż związki typu kwasów porostowych hamują powstawanie nekroz wirusa mozaiki tytoniowej, to jednak znacznie słabiej niż frakcja policukrowców. Zasadniczym czynnikiem warunkującym inhibitorowe własności *Cetraria islandica* jest policukier złożony z glukozy, galaktozy i mannozy. Doświadczenia przemawiające za słusznością tego zdania przedstawione są w niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Spośród różnych porostów wykazujących inhibitorowe własności w stosunku do WMT, do badań wybrano porost islandzki (*Cetraria islandica* L.). Wybór ten podyktowany był względami praktycznymi, bowiem porost ten można nabywać w większych ilościach w sklepach zielarskich. Materiał taki posłużył do doświadczeń.

Próby biologiczne na obecność inhibitorów wykonywano na liściach *N. glutinosa*; źródłem WMT był odpowiednio rozcieńczony preparat czystego wirusa. Inne szczegóły metodyczno-techniczne opisano w pracach poprzednich (Gubański 1963).

Próby chemiczne na obecność białek i cukrów wykonywano powszechnie przyjętymi metodami. Azot oznaczano metodą mikro-Kjeldahla.

Hydrolizę materiału (30 mg preparatu) przeprowadzano w zatopionych fiolkach szklanych z 1 ml kwasu siarkowego (0,5 N) w czasie 6—12 godz. na wrzącej łaźni wodnej. Hydrolizat zobojętniano węglanem baru, osad odwirowywano. Zawartość cukrów redukujących w hydro-

lizatach preparatów oznaczano metodą Hagedornia-Jensena wg Brzeskiego i Kaniugi (1960).

Cukry identyfikowano na drodze chromatograficznej i elektroforetycznej.

Elektroforezę cukrów przeprowadzano w buforze boranowym 0,05 M o pH zasadowym w czasie 2—3 godzin przy napięciu 280 V.

Chromatogramy rozwijano techniką wstępującą na bibule Whatman 1. Rozwijacze przygotowywano stale świeże.

Do wybarwiania cukrów stosowano ftalan aniliny oraz alfa naftol; przy wybarwianiu elektroforegramów ftalan aniliny zakwaszono kwasem octowym (Lederer 1955).

Do frakcjonowania wyciągów stosowano wyłącznie etanol skażony metanolem.

IZOLOWANIE INHIBITORÓW

Ekstrakcja acetonem. Porost poddawano kolejno dwójakiego rodzaju ekstrakcji: acetonowej i wodnej. Ekstrakcję acetonem prowadzono (podobnie jak i wodną) w ciągu doby w temp. pokojowej, jak i wyższej, na łaźni wodnej. Z prac poprzednich wiadomo, że inhibitor z porostów jest termostabilny.

Do jednorazowej ekstrakcji brano 100—200 g plechy porostowej rozdrobionej w młynku od kawy.

Rozdrobniony porost zalewano 1/2 l acetonu i podgrzewano na łaźni wodnej przez 40 min. Po odsączeniu acetonu, przy użyciu wodnej pompy próżniowej, ekstrakcję powtarzano. Połączone ekstrakty odparowywano albo poddawano frakcjonowaniu poniższym sposobem.

Ekstrakt acetonowy (4 obojętności) rozcieńczano 1 obojętnością wody, a wytrącający się osad odwirowywano i suszono w temp. pokojowej. Frakcja zawiera dużą ilość barwników oraz związków rozpuszczalnych w acetonie. Po odparowaniu płynu na dnie pozostał materiał o barwie i konsystencji czarnej pasty do butów.

Pozostały klarowny płyn rozcieńczano nadmiarem wody i zakwaszono 10% kwasem solnym. Po 24-godzinnym odstaniu płyn nad osadem częściowo dekantowano, a częściowo odwirowywano. Po kilkakrotnym przemyciu wodą i eterem osad suszono w temp. pokojowej. Frakcja ta zawiera głównie, jeżeli nie jedynie, kwasy porostowe. Aktywność antywirusowa poszczególnych frakcji podana jest w tabeli 1.

Z danych tych widać, że zarówno ekstrakt acetonowy, jak i frakcja kwasów porostowych wykazują pewne własności antywirusowe. Te ostatnie jednak, nawet przy stęż. 2,5 mg, hamują reakcję nekrotyczną WMT tylko częściowo, natomiast ekstrakt wodny, z wielokrotnie eluowanej acetonem plechy, zachowuje praktycznie niezmienioną aktywność antywirusową. Można stąd wnosić, że w materiale tym występują jeszcze

związki o innym charakterze, nierozpuszczalne w acetonie, posiadające zdolność hamowania nekroz.

Frakcjonowanie ekstraktów wodnych. Wyeluowany acetonem porost zalewano wodą destylowaną, następnie płyn wyciskano przez gazę i wirowano. Tak sporządzony eluat poddawano frakcjonowanemu wytrącaniu etanolem.

Tabela 1 — Table 1

Inhibitorowe własności ekstraktów acetonowych z *Cetraria islandica* L.

Inhibitory properties of acetone extracts from *Cetraria islandica* L.

Ekstrakt acetonowy Acetone extract	Fracja barwników Dye fraction	Fracja kwasów porostowych*) C. islandica acid fraction	
		Conc. 2,4 mg/ml	Conc. 0,25 mg/ml
$\frac{48}{23}$	$\frac{48}{57}$	$\frac{40}{13}$	$\frac{40^{**}}{31}$

* Odważkę kwasów porostowych zalewano wodą, a następnie kroplami dodawano ług do uzyskania pH obojętnego.

A given amount of acid was dissolved in water and then alkali added in a droplets until neutral pH was obtained.

** Liczba w liczniku odpowiada średniej arytmetycznej ilości nekroz przypadających na liść kontrolny, w mianowniku — liczbie nekroz z preparatem.

The numerator — arithmetical mean number of lesions on one half of a leaf; denominator — number of lesion after treatment.

1 objętość ekstraktu mieszano z 1 objętością 96% etanolu i pozostawiano w lodówce w czasie 24 godzin. Klarowny płyn dekantowano a pozostałość wirowano. Osad eluowano wodą i ponownie poddawano wytrącaniu etanolem. Osad przechowywano w etanolu bądź suszono w temp. pokojowej.

Klarowny płyn zadawano 1/2 objętości etanolu i kilkoma kroplami kwasu octowego, a po usunięciu osadu dalszym nadmiarem etanolu i zbierano wytrącający się osad. Postępując w ten sposób uzyskano 3 frakcje związków, których charakterystykę podano w tabeli 2.

Z danych w tabeli 2 widać, że związki antywirusowe wytrącają się z roztworów przy stosunku etanolu do ekstraktu 75:25.

W oparciu o to rozeznanie, izolowanie związków antywirusów w dalszych doświadczeniach przeprowadzano następująco: wyekstrahowany materiał acetonem eluowano na gorąco 50% etanolem. Po ostudzeniu, ekstrakt oddzielano: najpierw za pomocą gazy, a następnie wirowania przy 3000 obrotów/min. Klarowny płyn z kolei mieszano z etanolem (1 objętość ekstraktu + 4 objętości etanolu) i zakwaszano kwasem octowym. Tak wytrącony osad rozpuszczano w wodzie, usuwano nierozpuszczalne części na drodze wirowania, mieszano ponownie z etanolem w stosunku 1:1, osad usuwano, a klarowny płyn zadawano dalszą porcją eta-

nolu (80—20). Osad z kolei oddzielano i procedurę powyższą powtarzano kilkakrotnie. Następnie preparat przemywano $2 \times$ etanolem 96%, acetonem i eterem.

Tabela 2 — Table 2

Hamowanie nekroz WMT przez wyciągi wodne z porostu *Cetraria islandica* L.
TMV lesions inhibitor by water extracts from *Cetraria islandica* L.

Frakcja wytrącona przy stosunku etanolu do wyciągu Fraction precipitated at ethanol to extract ratio:	Hamowanie nekroz Local lesion inhibition	Rozpuszczalność w wodzie Solubility in water
50 : 50	$\frac{50}{43}$ *	
75 : 25	$\frac{50}{3}$	Znaczna część materiału po wyschnięciu nierozpuszczalna w wodzie After drying a great amount is insoluble in water
Nadmiar etanolu Surplus of ethanol	$\frac{50}{1}$	Związki po wyschnięciu roz- puszczalne w wodzie Compounds soluble in water after drying

* Patrz objaśnienie do tabeli 1. See explanations to table 1.

W wyniku tych zabiegów na dnie probówki pozostawał biały proszek (frakcja a). Do badań chemicznych preparat taki poddawano dodatkowo oczyszczaniu: po rozpuszczeniu w wodzie roztwór emulgowano

Tabela 3 — Table 3

Aktywność anti-WMT preparatów z *Cetraria islandica* L.
Activity of anti-TMV preparations obtained from *Cetraria islandica* L.*

Numer preparatu No. of preparation	4		5		6**	
Stężenie Concentration	a	b	a	b	a	b
1 mg/ml	$\frac{89}{2}$	$\frac{89}{4}$	—	—	—	—
0,1 mg/ml	$\frac{90}{6}$	$\frac{90}{13}$	$\frac{39}{2}$	$\frac{29}{6}$	$\frac{58}{5}$	—

* Patrz objaśnienia do tabl. 1. See explanations to tabl. 1.

** Preparat opracowany chloroformem. Preparation obtained with chloroform.

z chloroformem, odwirowywano, klarowny płyn (faza wodna), zaś wytrącano etanolem i opracowywano kolejno powyższymi związkami (etanol, aceton, eter).

Należy jednak zauważyć, że z ekstraktów porostowych sporządzanych za pomocą 50% etanolu, a wytrąconych 4 objętościami etanolu, przy dalszym zwiększeniu stężenia etanolu można było uzyskać jeszcze dalszą porcję osadu (frakcja b), która różniła się od omówionej wyżej frakcji a, brunatnym zabarwieniem. Skład chemiczny hydrolizatów obu frakcji był jednak taki sam, dlatego też analizę chemiczną ograniczono tylko do frakcji a.

Ze 150 g plechy porostowej uzyskiwano 150—100 mg preparatu a, oraz 20—30 mg preparatu b. Oba preparaty, chociaż wolno, rozpuszczają się w wodzie i silnie hamują reakcję nekrotyczną WMT na liściach *N. glutinosa* (tabl. 3).

Jest wielce prawdopodobne, że związki wchodzące w skład tych frakcji są w głównej mierze odpowiedzialne za anty-WMT własności porostów. Nawet jeżeli przyjmie się, że izolowana ilość związków odpowiada ich rzeczywistemu stężeniu w porostach, chociaż w czasie izolowania mogą zachodzić znaczne straty, to ilość ta jest wystarczająca dla wytłumaczenia aktywności antywirusowej wyciągów porostowych.

NATURA CHEMICZNA INHIBITORÓW Z POROSTÓW

Chociaż 94—96% masy preparatów hydrolizowanych zidentyfikowano jako cukry redukujące (w przeliczeniu na glikozę), to jednak istnieje pewne prawdopodobieństwo, że jest to mieszanina związków. Z tego względu preparaty poddawano chromatografii bibułowej. Niestety metoda ta w tym przypadku okazała się nie zadowalająca, ponieważ reeluaty z bibuły nie wykazywały aktywności antywirusowej. Najprawdopodobniej było to związane z ich adsorpcją na bibule. Możliwe do przyjęcia wyniki uzyskiwano jedynie przy zastosowaniu jako rozwijacza 80% etanolu. Jak widać, jednak z tabl. 4, nawet w tym przypadku aktywność reeluatu była znacznie mniejsza niż preparatu wyjściowego.

Niezależnie od tych zastrzeżeń z wyników podanych w tabl. 4 widać, że przy zastosowaniu 80% etanolu jako rozwijacza, inhibitory pozostają na starcie bibuły. Odpowiedni wycinek bibuły dawał ujemną reakcję ninhydrynową, ujemną reakcję z błękitem bromotymolowym (wybarwianie jak przy elektroforezie białek) oraz ujemną reakcję z ftalanem aniliny.

Z podanych powodów analizy chemiczne ograniczono do preparatów uzyskanych na drodze frakcjonowanego wytrącania (tabl. 3 preparat 6 a). Preparaty te dają w próbówce ujemną reakcję biuretową (stęż. 10 mg/ml)

oraz nie zawierają azotu. Hydrolizaty preparatów — dawały natomiast dodatnią reakcję na cukry redukujące.

Hydrolizaty nakładano na bibułę Whatman 1 i rozwijano w różnych rozwijaczach (butanol — etanol — woda (4:2:2), butanol — kwas octowy — woda (4:2:2), metyloetyloketon fenol, alkohol izoamylowy — kwas octowy — woda. Odcinki bibuły dawały dodatnią reakcję z ftalanem aniliny, ujemną z alfa-naftolem oraz ninhydriną. Można stąd wnosić, że podstawowym składnikiem preparatów jest policukier złożony z aldoz, a z odcienia barwy — że są nimi heksozy.

Tabela 4 — Table 4

Aktywność anti-WMT preparatów poddanych chromatografii na bibule (rozwijacz — 80% etanol)

Activity of anti-TMV preparations separated by paper chromatography (developer — 80% ethanol)

Liczba nekroz na 1 połowie liściowej N. glutinosa					
The number of lesion on one half of a N. glutinosa leaf					
kontrola Control	WMT+preparat	1	2	3	4*
92	1	14	80	95	101

* 1 — eluat z bibuły obejmującej linię startową oraz strefę do niej przylegającą. Cyfry kolejne odpowiadają odcinkom wyżej leżącym.

1 — extract of chromatogram including the starting the adjacent zone. Number corresponds to successive sections of blotting paper lying above.

Odpowiednie cukry, stosując chromatografię jednokierunkową (chromatogramy rozwijano jednokrotnie, dwukrotnie i trzykrotnie; przy użyciu różnych rozpuszczalników) oraz elektroforezę z zastosowaniem buforów boranowych, zidentyfikowano jako: glukozę, mannozę i galaktozę. Nie stwierdzono natomiast w hydrolizatach kwasów uranowych oraz pentoz.

DYSKUSJA

W pierwszej pracy, w której opisano obecność inhibitorów wirusa mozaiki tytoniowej w porostach, wskazano na kwasy porostowe jako jeden z czynników warunkujących te własności (Moycho, Gubański, Rennert 1959). W dalszych pracach, w związku ze stwierdzeniem w tym materiale rybonukleazy, enzymu, o którym wiadomo, że hamuje infekcję wirusów, sugerowano również związek między rybonukleazą a antywirusowymi własnościami wyciągów porostowych (Ren-

nert i Gubański 1961). Niewątpliwie, czynniki te — kwasy porostowe, rybonukleaza — skoro tam występują, to w dużej mierze mogą wpływać na ilość wirusa mozaiki tytoniowej.

Obok nich jednak w porostach występują policukry, które w zasadniczej mierze mogą sankcjonować inhibitorowe własności wyciągów porostowych.

Policukier ten posiada jakościowy skład bardzo zbliżony do chemicelulozy wyizolowanej z porostu *Cetraria islandica* przez Granchstadtena i Percivala (1953). Chemiceluloza ta jednak zawiera kwas uronowy i jest rozpuszczalna w ługu. Jeżeli jednak kwasy urowe występują w małych ilościach, to wykrycie ich na drodze chromatograficznej jest trudne.

Bardziej prawdopodobny jednak wydaje się pogląd, zgodnie z którym policukier ten jest mieszaniną licheniny — polimeru glukozy i galaktomannanów — polimeru galaktozy mannozy; zarówno lichenina, jak i galaktomannany są rozpuszczalne w wodzie (Whistler i Smart 1953). Należy nadmienić, że galaktomannonową naturę ma inhibitor WMT z liści porażonych grzybem *Rhytisma acerinum* (Gubański i Saniowski 1964) oraz najprawdopodobniej ze sporyszu (Gubański, 1964). Nie jest więc wykluczone, że heteroglukony te, ze względu na powszechne występowanie, sankcjonują inhibitorowe własności wielu grzybów, a być może i roślin wyższych.

STRESZCZENIE

Na drodze frakcjonowanego wytrącania etanolem z wyciągów wodnych *Cetraria islandica* L. wyizolowano policukier złożony z glikozy, galaktozy i mannozy. Cukier ten bardzo silnie hamuje nekrozy wirusa mozaiki tytoniowej na liściach *Nicotiana glutinosa*. Policukier ten może być w głównej mierze odpowiedzialny za inhibitorowe własności wyciągów z porostów.

SUMMARY

In a process of fractional extractions by means of ethanol from water extracts of *Cetraria islandica*, a polisaccharide composed of glucose, galactose and mannose has been isolated.

The polisaccharide is a strong inhibitor of Tobacco Mosaic Virus lesions on *Nicotiana glutinosa* leaves. This compound may account for inhibitory properties of extracts from lichens.

LITERATURA

- Brzeski W., Kaniuga Z., 1957, Ćwiczenia z biochemii roślin, PWN.
Granchstadten H., Percival E. G. V., 1953, cyt. wg Biochemiczeskije Metody Analiza Rastienii, In. Izdat. 273.

- Gubański M., 1963, Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej z kłosarzy, Acta Soc. Bot. Pol., 32:429.
- Gubański M., 1964, Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej w sporyszu, Acta Soc. Bot. Pol. 33:645.
- Gubański M., Saniewski M., Inhibitor WMT z liści klonu porażonych grzybem *Rhytisma acerinum* (nie publ.).
- Lederer , 1955, Elektroforez na bumagie, Wyd.: Inoswamaja Literatura, Moskwa.
- Moycho W., Gubański M., A. Rennert, 1959, Wyciąg z *Cetraria islandica* inhibitorem wirusa mozaiki tytoniowej, Acta Soc. Bot. Pol. 28:185.
- Moycho W., Gubański M., Kędziora T., 1960, TWV inhibitors in Lichens, Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. 11, VIII:209.
- Rennert A., Gubański M., 1962, Badania nad rybonukleazą z porostu *Cetraria islandica*, Acta Soc. Bot. Pol. 31:25.
- Whistler R. L., C. L. Smart, 1953, Polisacharide chemistry, Acad. Press, New York.