Próby izolowania i indentyfikacji inhibitora wirusa mozaiki tytoniowej (WMT) z niektórych gatunków purchawek (*Lycoperdon*)

Attempts at isolation and identification of TMV inhibitor from some species of Lycoperdon

M. GUBAŃSKI, M. SANIEWSKI

WSTĘP

Bogatym źródłem inhibitorów wirusów roślinnych są grzyby. Niektóre tego typu czynniki antywirusowe występujące w grzybach zostały zidentyfikowane i mają charakter antybiotyków, jak np. trichotecyna — produkowana przez kultury *Trichothecium roseum* (Bawden i Freeman 1952) i noformicyna — wyizolowana z kultur grzyba *Nocardia* (Gray 1955).

Znanych jest też wiele innych grzybów, należących do różnych grup systematycznych, w których stwierdzono obecność inhibitorów wirusów roślinnych, ale natura chemiczna tych związków jak dotąd nie została poznana (Sudô, Yoshida i Sudô, 1949; Gupta i Price 1950; Utech i Johnson 1950; Slage, Wolcyrz i Price 1952; Klinkowski 1954; Bobyr 1964).

Występowanie związków antywirusowych stwierdzono również w porostach (Moycho i współaut. 1959, 1960; Follmann i Villagran 1964).

W pracy niniejszej podjęto próby izolowania i indentyfikacji inhibitora wirusa mozaiki tytoniowej z *Lycoperdon piriforme* i *L.sp.*

O właściwościach antywirusowych purchawek, tj. *Lycoperdon cruciatum* Rostk., *L. piriforme* Schaeff., *L. Wrightii* Bk. et Curt. i *Lycoperdon sp.* donoszą po raz pierwszy Utech i Johnson (1950). Stwierdzili oni, że wyciągi wodne z tych gatunków po zmieszaniu z WMT silnie redukują powstawanie nekroz na liściach hybryda *Nicotiana tabacum* × *N. glutinosa*.

Z kolei Klinkowski (1954) donosi o własnościach inhibitorowych *L. gemmatum* Batsch. Podaje przy tym, że inhibitor zawarty w ekstrakcie wodnym jest oporny na podgrzewanie w ciągu 10 min. w temp. 100°C i nie eluuje się eterem.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń stosowano odpowiednio rozcieńczony preparat czystego wirusa mozaiki tytoniowej otrzymany z tytoniu na drodze wysalania siarczanem amonu.

Rośliną testową była *Nicotiana glutinosa* hodowana w szklarni po 6 szt. w skrzynce. Doświadczenia prowadzono po uformowaniu się minimum 6 dobrze rozwiniętych liści. Liście, uprzednio zroszone karborundem, zakażano wirusem lub mieszaniną wirusa z odpowiednim preparatem za pomocą tamponika z gazy przez lekkie wcieranie.

Źródłem inhibitorów były dojrzałe owocniki 3 gatunków purchawek; *Lycoperdon piriforme* Schaeff., *L. bovista* L., *L. sp.* i gat. pokrewny rodzajowi *Lycoperdon* — *Bovista plumbea* Pers., zbierane w miesiącach sierpień — wrzesień 1964 r. i przechowywane w temp. pokojowej.

Frakcjonowanie wyciągów prowadzono etanolem 96%. Metody: hydrolizy, ilościowego oznaczania i identyfikacji cukrów podane są w innej naszej pracy (Gubański i Saniewski 1964).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Inhibitory wirusa mozaiki tytoniowej w wyciągach wodnych z purchawek.

Ekstrakty wodne sporządzano przez silne roztarcie w moździerzu 1 g powietrznie suchej masy poszczególnych gatunków w 20 ml wody destylowanej. Tak przygotowany materiał wstawiano do lodówki na 1 dobę, po czym odwirowywano, a płyn z nad osadu przesączano i badano na obecność inhibitorów. W tym celu ekstrakty mieszano z wirusem w stosunku 1 : 1 i wcierano w górną powierzchnię blaszki liściowej *N. glutinosa*. Kontrolę stanowił wirus o takim samym rozcieńczeniu. Własności antywirusowe mierzono ilością powstałych nekroz (tabela 1).

Tabela 1 — Table 1

Wpływ ekstraktów wodnych z kilku gat. rodzaju *Lycoperdon* i z *Bovista plumbea* Pers. na ilość nekroz WMT na liściach *N. glutinosa*

Influence of aqueous extracts from several species of genus *Lycoperdon* and *Bovista plumbea* Pers. on the quantity of local TMV lesions on the leaves of *N. glutinosa*

Ilość nekroz na 6 połówkach liściowych Quantity of local lesions on 6 halves of leaves							
<i>L. piriforme</i>		<i>L. sp.</i>		<i>L. bovista</i>		<i>Bovista plumbea</i>	
k	d	k	d	k	d	k	d
974	0	930	0	418	1	423	7

k — kontrola (control)

d — WMT+ekstrakt (TMV+extract)

Tabela 2 — Table 2

Wpływ temperatury i dializy na aktywność inhibitora z *L. piriforme*
 Influence of temperature and dialysis on the activity of the inhibitor
 from *L. piriforme*

Ilość nekroz na 6 połówkach liściowych <i>N. glutinosa</i> Quantity of local lesions on 6 halves of leaves <i>N. glutinosa</i>			
Kontrola Control	WMT+ekstrakt TMV+extract	WMT+ekstrakt podgrzany TMV+heated extract	WMT+ekstrakt dializowany TMV+dialysed extract
265	4	7	5

Z następnej tabeli 2 widać, że badany wyciąg wodny z *L. piriforme* zachowuje zdolność hamowania nekroz po podgrzaniu na łaźni wodnej w ciągu 15 min. w temp. 100°C oraz po 24 godzinnej dializie przez błony celofanowe wobec wody destylowanej. Z otrzymanych wyników można sądzić, że inhibitor z purchawek jest termostabilny i ma naturę wielkocząsteczkową.

2. Izolowanie inhibitora

30 g powietrznie suchych purchawek, celem odlipidowania, ekstrahowano eterem dwuetylowym w aparacie Soxhleta w ciągu 5 godzin. Ekstrakt eterowy odparowywano, a purchawki zadawano 70% alkoholem etylowym i po silnym rozrztarciu pozostawiano w lodówce na 1 dobę. Po oddzieleniu ekstraktu alkoholowego materiał ponownie eluowano 70% etanolem, ale podgrzanym do temp. 70°C, przez okres 15 min.

Tak potraktowane purchawki ekstrahowano z kolei wodą jak w poprzednim rozdziale. Pozostałość po odwirowaniu odrzucano, a przesączony klarowny eluat wodny zadawano etanolem 96% w stosunku 1 objętości alkoholu na 1 objętość wyciągu i pozostawiano w lodówce na okres kilku dni. Po upływie tego czasu strącony osad odwirowywano, a płyn z nad osadu zadawano powtórnie 96% etanolem do końcowego stężenia alkoholu 80% z dodatkiem kilku ml kwasu octowego. Wytrącony osad, który był preparatem antywirusowym oddzielano na drodze wirowania i kolejno przemylano etanolem 96%, acetonem i eterem.

W wyniku powyższych manipulacji z 30 g purchawek branych do analizy otrzymywano około 150 mg powietrznie suchego preparatu barwy szarawej, dobrze rozpuszczającego się w wodzie i silnie hamującego powstawanie nekroz wirusa mozaiki tytoniowej.

Oba ekstrakty alkoholowe odparowywano oddzielnie na promienniku podczerwieni i otrzymywano gęstą, syropową masę; z 70% wyciągu alkoholowego, używanego do ekstrakcji na zimno, otrzymano 5 g takiej masy, a z takiego samego wyciągu podgrzanego do temp. 70°C—2,5 g.

Tabela 3 — Table 3

Wpływ kolejnych frakcji z *L. piriforme* na ilość nekroz WMT na liściach *N. glutinosa*
 Influence of the subsequent fractions from *L. piriforme* on the quantity of lesions TMV local
 on the leaves of *N. glutinosa*

Frakcja Fraction	Liczba nekroz na 6 połówkach liściowych Number of local lesions on 6 halves of leaves	
	Kontrola Control	Próba doświadczalna Experiment
1. Ekstrakt eterowy* Ether extract*	504	408
2. Ekstrakt 70% etanolu** 70% ethanol extract**	385	96
3. Ekstrakt 70% etanolu podgrzanego do 70°C** 50% ethanol extract heated to 70°C**	438	66
4. Frakcja wytrącona z wyciągu wodnego etanolem 96% w stosunku 1 : 1 Fraction precipitated from aqueous extract with 96% ethanol (1 : 1)	Frakcja ta była bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie i nie używano jej do badań This fraction was very slightly soluble in water and it has not been examined	
5. Frakcja wytrącona etanolem o końcowym stężeniu alkoholu 80%*** Fraction precipitated with ethanol with the terminal concentration 80%***	723	4

* Odparowany ekstrakt eterowy eluowano taką ilością wody, aby końcowe stężenie odpowiadało stężeniu ekstraktu sporządzonego z 1 g purchasek w 20 ml wody i mieszano z wirusem w stosunku 1 : 1

The evaporated ether extract was eluted with such a quantity of water that its final concentration would correspond the concentration of the extract prepared from 1 g of *Lycoperdon* in 20 ml of water. This was mixed together with virus in relation 1 : 1

** — Końcowe stężenie odparowanej frakcji po zmieszaniu z wirusem wynosiło 1 mg/ml

Final concentration of evaporated fraction when mixed with virus was 1 mg/ml

*** — Końcowe stężenie preparatu po zmieszaniu z wirusem wynosiło 0,2 mg/ml

Final concentration of preparation when mixed with virus was 0,2 mg/ml

Aktywność antywirusowa poszczególnych frakcji przedstawiona jest w tabeli 3.

Jak widać z wyników przedstawionych w powyższej tabeli inhibitor z purchasek nie ekstrahuje się eterem, eluuje się częściowo etanolem 70% zarówno na zimno, jak i na gorąco i wytrąca się z wyciągów wodnych etanolem o wysokim stężeniu.

W podany wyżej sposób otrzymano 2 × preparat inhibitora z *Lycoperdon piriforme* i raz z *Lycoperdon* sp.

Własności antywirusowe tych preparatów stosowanych w różnych stężeniach podane są w tabeli 4.

3. Charakterystyka chemiczna preparatów antywirusowych

Część otrzymywanych preparatów inhibitora z purchasek, po rozpuszczeniu w niewielkiej ilości wody, przy użyciu mikropipetki nakładano kilkakrotnie na bibułę Whatman nr 3 w postaci wąskiego pasemka, a po wysuszeniu rozwijano w układzie rozpuszczalników: butanol — kwas octowy — woda (4 : 2 : 2) na wysokość około 10 cm.

Tabela 4 — Table 4

Aktywność kolejno otrzymanych preparatów inhibitora z *Lycoperdon piriforme* i *Lycoperdon* sp. na ilość nekroz WMT na liściach *N. glutinosa*

Activity of subsequently obtained preparations of inhibitor from *Lyceperdon piriforme* and *Lycoperdon* sp. on the quantity of local TMV lesions on the leaves of *N. glutinosa*

Źródło inhibitora Source of inhibitor	Stężenie końcowe prpreparatów w mg/ml Terminal concentration of preparations in mg/ml									
	0,5		0,2		0,1		0,05		0,01	
	Liczba nekroz na 6 połówkach liściowych Quantity of local lesions on 6 halves of leaves									
	k	d	k	d	k	d	k	d	k	d
<i>Lycoperdon piriforme</i>	603	1	723	4	387 762	7 11	1034	45	928	453
<i>Lycoperdon</i> sp.	529	4	590	35						

k — kontrola (Control)

d — WMT + inhibitor (TMV + inhibitor)

Tabela 5 — Table 5

Lokalizacja inhibitora na chromatogramach po rozwinięciu preparatu antywirusowego z purchawek w układzie butanol — kwas octowy — woda (4 : 2 : 2) na podstawie liczby nekroz WMT

Localization of inhibitor in chromatograms after developing of the anti-virus preparation obtained from *Lycoperdon*. Developing solvent: butanol-acetic acid-water (4 : 2 : 2). The number of TMV lesions was used as an indicator of inhibitor presence

Źródło inhibitora Source of inhibitor	Ilość nekroz na 6 połówkach liściowych <i>N. glutinosa</i> Quantity of local lesions on 6 halves of leaves <i>N. glutinosa</i>					
	k	1	2	3	4	5
<i>L. piriforme</i>	907	13	601	816	679	665
<i>Lycoperdon</i> sp.	808	1	713	617	725	744
<i>Lycoperdon</i> sp.*	845	13	1079	935	1093	924

k — kontrola, odcinek leżący poniżej linii startowej,
control, segment below starting line

1 — odcinek obejmujący linię startową
segment including starting line

2—5 — odcinki chromatogramu przylegające kolejno do startu
consecutive segments from starting line

* — Preparat trzykrotnie rozwijano, aby jak najdalej przesunąć od startu smugi reagujące z ninhydryną; cyfry 2—5 w tym przypadku oznaczają odcinki szerokości kontroli (k) i startu (1), przylegające kolejno do linii startowej, nie reagujące z ninhydryną

In order to shift the places reacting with from the start as far as possible the preparation was developod three times. Numbers 2—3 in this case mean the segments of the width of control (k) and of the start (1), adhering subsequently to the starting line, non reacting with ninhydrin

Po wybarwieniu wąskiego pasma rozwiniętego chromatogramu ninhydryną pojawiało się kilka barwnych smug, co świadczy o obecności w badanym preparacie wolnych aminokwasów. Aby się przekonać, jakie położenie zajmuje na chromatogramie związek odpowiedzialny za własności inhibitorowe, chromatogram dzielono na 5 części biorąc pod uwagę wycinek chromatogramu wybarwiony ninhydryną, a poszczególne frakcje eluowano z bibuły buforem fosforanowym o pH 6,8 przez 2 dni w lodówce. Kontrolę stanowił w ten sam sposób eluowany wycinek czystej bibuły o odpowiedniej szerokości z rozwiniętego chromatogramu. Aktywność anty-WMT każdej frakcji badano po zmieszaniu z wirusem w stosunku 1 : 1. Użyte wyniki podane są w tabeli 5.

Z wyników przedstawionych w tabeli 5 widać wyraźnie, że związek odpowiedzialny za własności anty-WMT pozostaje zawsze w miejscu nałożenia go na chromatogram, nawet w wyniku kilkakrotnych rozwijań w stosowanym układzie rozpuszczalników.

Po kilkakrotnym rozwijaniu preparatów inhibitora na chromatogramach eluowano frakcję anty-WMT pozostającą na starcie i hydrolizowano 1 N kwasem siarkowym w zatopionych fiolkach szklanych na wrzącej łaźni wodnej w czasie 6—10 godz., a z kolei hydrolizat, po uprzednim zabojętleniu węglanem baru (BaCO_3), poddawano rozdzielowi chromatograficznemu w tym samym układzie rozpuszczalników.

Po wybarwieniu rozwiniętych chromatogramów ftalanem aniliny stwierdzono obecność cukrowców, a po wywołaniu ninhydryną uwidaczniały się 4 barwne smugi, co świadczyłoby o występowaniu białka względnie peptydu.

Na podstawie powyższych wyników i wyników przedstawionych w tabeli 2 można przypuszczać, że o własnościach antywirusowych preparatu z purchawek decyduje wielocukrowiec.

W efekcie wielokrotnych powtórzeń chromatogramów stwierdzono, że żaden z cukrów hydrolizatu nie dawał reakcji z α -naftolem, co wyklucza obecność ketoz, a przez wywoływanie ftalanem aniliny uwidaczniały się 4 barwne plamy, które zidentyfikowano jako; glikozę, mannozę, arabiozę i 4-tą plamę, której położenie odpowiada położeniu fukozy.

Z intensywności barw poszczególnych cukrów na chromatogramach można sądzić, że w największej ilości występuje glikoza; a w najmniejszej arabinoza.

Na elektroferogramach otrzymano 2 wyraźne plamy, z których jedna, położona bliżej startu to mannoza, a druga — to glikoza + arabinoza (ruchliwość tych cukrów jest zbliżona i dlatego brak rozdziału).

Co do 4-go cukru obecnego na chromatogramach a niewidocznego na elektroferogramach, to przypuszcza się, że jest nim najprawdopodobniej fukoza, bo jak wiadomo, ten tylko cukier na elektroferogramach daje wydłużoną plamę (Foster 1962), a ponieważ występuje w małych ilościach — jest w ogóle niedostrzegalny.

Należy podkreślić obecność tych samych cukrów prostych w preparatach antywirusowych po hydrolizie zarówno u *L. piriforme*, jak i u *L. sp.*

W preparatach inhibitora z *L. piriforme* oznaczono zawartość cukrów redukujących, które w przeliczeniu na glikozę stanowią około 24%.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Wysoką intensywnością hamowania nekroz WMT, jak wykazano w niniejszej pracy, charakteryzują się także inne gatunki purchawek, tj. *Lycoperdon bovista* L., *L. sp.* i gatunek pokrewny rodzajowi *Lycoperdon* — *Bovista plumbea* Pers.

Na podstawie powyżej przedstawionych badań własnych można sądzić, że inhibitor z purchawek ma najprawdopodobniej naturę policukrową. Mniej prawdopodobne wydaje się, aby ten wysokocząsteczkowy związek antywirusowy był białkiem, ponieważ preparat inhibitora otrzymany przez wytrącanie etanolem o końcowym stężeniu 80% i przemywany 96% alkoholem charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną i jest termostabilny. Białkiem o stosunkowo dużej odporności na działanie temperatury, a które hamuje powstawanie nekroz WMT jest rybonukleaza.

Inhibitory WMT natury policukrowej znane są także w wielu innych grzybach. I tak Bawden i Freeman (1952) z kultur grzyba *Trichothecium roseum*, oprócz trichotecyny, wyizolowali wielocukier o własnościach anti-WMT, w którym 45% stanowi d-galaktoza, a Takahashi (1942, 1946) otrzymał policukier o własnościach antywirusowych z drożdży.

Wielocukrem również jest inhibitor WMT z liści klonu porażonych grzybem *Rhytisma acerinum* Pers. (Gubański i Saniewski 1964), z porostu *Cetraria islandica* (Gubański 1965) i najprawdopodobniej inhibitor z *Claviceps purpurea* (Gubański 1964). Własności antywirusowe wykazuje także policukier otrzymany z *Torulopsis neoformans* złożony z ksylozy, mannozy i kwasu uronowego (Hirth i Drouhet 1953).

Problem dokładniejszego poznania natury chemicznej inhibitora WMT z purchawek i mechanizm jego działania wymaga dalszych szczegółowych badań.

Pani Doc. dr W. Maciejewskiej-Potapczykowej — składam serdeczne podziękowanie za pomoc w przygotowaniu pracy do druku.

Streszczenie

Na drodze frakcjonowania wytrącania etanolem z wyciągów wodnych *Lycoperdon piriforme* i *Lycoperdon sp.* otrzymano preparat o silnych własnościach hamowania reakcji nekrotycznej WMT na liściach *Nicotiana glutinosa*.

Na podstawie analizy chemicznej preparatu anti-WMT z purchawek i niektórych własności inhibitora można sądzić, że jest nim występujący w tym preparacie policukier względnie policukry. Cukrami występującymi w preparacie po jego hydrolizie są; glikoza, mannoza, arabinoza i prawdopodobnie fukoza.

SUMMARY

The preparation strongly inhibiting the local TMV lesions occurring on the leaves of *Nicotiana glutinosa* was obtained in the way of fractional precipitation with ethanol from aqueous solutions of *Lycoperdon piriforme* and *Lycoperdon* sp.

Basing on the chemical analysis of the anti-TMV preparation from *Lycoperdon* and some of their inhibitory properties, it can be assumed that it is a polysaccharide or polysaccharides. The saccharides present in this preparation after its hydrolysis are: glucose, mannose, arabinose and probably fucose.

LITERATURA

- Bawden T. C., Freeman G. G., 1952, The nature and behavior of inhibitors of plant viruses produced by *Trichothecium roseum* Link, J. Gen. Microbiol. 7: 154.
- Bobyry A. D., 1964, Antywirusnyje swojstwa niekatorych antybiotikow i drugich wieszczestw, W pracy zbior. pod red. K. S. Suchowa "Wirusnyje bolezni sielskochozajstwiennych rastenii i miery borby z nimi", Izdat. Kolos, Moskwa, 54.
- Brzeski W., Kaniuga Z., 1957, Ćwiczenia z biochemii roślin, PWN, Warszawa.
- Follmann G., Villagran V., 1964, Flechtenstoffe als Virusinhibitoren, Naturwissenschaften 51: 543.
- Foster A. B., 1962, Zone electrophoresis, W pracy zbior. pod red. R. L. Whistlera i M. L. Wolfroma "Analysis and Preparation of Sugars", Academic Press, New York and London, vol. I, 51.
- Gray R. A., 1955, Activity of an antiviral agent from *Nocardia* on two viruses in intact plants, Phytopathology 45: 281.
- Gubański M., 1964, Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej ze sporyszu (*Claviceps purpurea*), Acta Soc. Bot. Pol. 33: 645.
- Gubański M., 1965, Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej z porostu *Cetraria islandica* L., Acta Soc. Bot. Pol. 34: 353.
- Gubański M., Saniewski M., 1964, Polysaccharides from *Acer platanoides* L. and *Acer pseudo-platanus* L. leaves infected with *Rhytisma acerinum* Pers. as a TMV inhibitors, Acta Microbiol. Polon. 13: 227.
- Gupta B. M., Price W. C., 1950, Production of plant virus inhibitors by fungi, Phytopathology 40: 642.
- Hirth L., Drouhet E., 1953, Inhibition du virus de la mosaïque du tabac par le polyside capsulaire de *Torulopsis neoformans*. Ann. inst. Pasteur 84: 437.
- Klinkowski M., 1954, The inactivation of tobacco mosaic virus by fungal metabolic products, Mitt. biol. Bundesanst. Land und Forstwirtschaft, 80: 162 (cyt. wg. Chem. Abstr.).
- Lederer E., 1956, Elektroforez na bumagie, Inostrannoje Izdat., Moskwa.
- Moycho W., Gubański M., Rennert A., 1959, Wyciąg z porostu *Cetraria islandica* inhibitorem wirusa mozaiki tytoniowej, Acta Soc. Bot. Pol. 28: 185.
- Moycho W., Gubański M., Kędziora T., 1960, Tobacco mosaic virus (TMV) inhibitors in Lichens, Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II, 8: 209.
- Opieńska — Blauth J., (red.) 1957, Chromatografia, PWN, Warszawa.
- Slagle C. W., Wolcyz S., Price W. C., 1952, Inhibition of plant virus infection by growth products *Neurospora*, Phytopathology 42: 240.
- Sudô E., Yoshida T., Sudô S., 1949, Inhibitory effect of the extract of *Pachyma hoelen* or *Polyporus chuling* in the infection of tobacco mosaic virus, Science (Japan) 19: 377 (cyt. wg. Chem. Abstr.).
- Takahashi W. N., 1942, A virus inactivator from yeast, Science 95: 586.
- Takahashi W. N., 1946, Properties of a virus inactivator from yeast, Science 104: 377.
- Utech N. M., Johnson J., 1950, The inactivation of plant viruses by substances obtained from bacteria and fungi, Phytopathology 40: 247.