

## WPŁYW ALKALOIDÓW NA NAMNAŻANIE SIĘ WIRUSA X ZIEMNIAKA W LIŚCIACH TYTONIU

*Maria Kamieńska-Żyła*

Pracownia Wirusologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN, Kraków

Od lat w literaturze ukazuje się corocznie wiele prac dotyczących wpływu inhibitorów na zakażenie wirusami roślin. Nie udało się jednak odkryć jakichś skutecznych sposobów zwalczania wirusów.

### ISTOTA HAMOWANIA

Problem istoty hamowania do dziś nie został wyjaśniony. Według Bawdena [7] inhibitory są substancjami, które tak zmieniają fizjologię komórek gospodarza, że nie „sprzyjają” dalszemu namnażaniu się wirusa.

Istnieją trzy możliwości mechanizmu działania inhibitora:

- 1) czy działa on hamująco na metabolizm przemian biochemicznych roślin-gospodarza, w której namnaża się wirus,
- 2) czy też równocześnie na gospodarza i na wirusa,
- 3) czy też tylko i wyłącznie na wirusa?

Najkorzystniejsze byłoby poznanie takich inhibitorów, które działałyby tylko na cząsteczkę wirusa i mogły hamować jego dalsze namnażanie się. Niestety takich inhibitorów dotychczas nie poznano. W świetle nowej teorii namnażania się wirusa musiałby to być inhibitor takiego typu, który by zapobiegał łączeniu się pojedynczej nici (nić +) kwasu rybonukleinowego z drugą nicią (nić —), a zatem blokował działanie enzymu replikazy w I etapie namnażania się wirusa, tj. w okresie najwcześniejszych zmian, jakie zachodzą pod wpływem wirusa w komórce rośliny.

### PODZIAŁ INHIBITORÓW

Według Bawdena [7] istnieją dwa typy inhibitorów: infekcji czyli procesu zakażenia oraz namnażania się wirusa. Inhibitory infekcji są to substancje, które już w momencie inokulacji, np. liści danej rośliny,

równocześnie wprowadzone z wirusem zapobiegają infekcji w mniejszym lub większym stopniu. Przez inhibitory namnażania się wirusa należy rozumieć te substancje, które stosuje się do roślin (najczęściej do liści) już inokulowanych; mogą one powstrzymać namnażanie się wirusa w różnym stopniu.

Inhibitory można podzielić ze względu na ich pochodzenie na dwie grupy: naturalne związki wytwarzane w żywych organizmach oraz otrzymane na drodze syntetycznej. Inny podział inhibitorów dotyczy wielkości ich cząsteczki:

- I — niskocząsteczkowe (niektóre antybiotyki, alkaloidy, taniny),
- II — wysokocząsteczkowe (białka, wielocukrowce i inne).

#### INHIBITORY WIRUSÓW ROŚLINNYCH W ŚWIETLE LITERATURY

Nie sposób przytoczyć tu bogatej literatury dotyczącej inhibitorów wirusów roślinnych. Ograniczę się w tej pracy przede wszystkim do prac dotyczących inhibitorów wirusa X ziemniaka (PVX-potato virus X), oraz alkaloidów — związków o różnorodnej budowie chemicznej — jako inhibitorów rozmaitych wirusów.

Simons, Ewidler i Moss [67] przebadali 75 gatunków różnych roślin z punktu widzenia inhibitorów wirusa mozaiki tytoniu i wirusa X ziemniaka i stwierdzili, że wyjątkowo czynne substancje występowały w roślinach należących do rodziny *Crassulaceae*.

Verma, Raychaudhuri [70-73] badając wpływ kilku ekstraktów z roślin leczniczych na infekcyjność wirusa X wykazali, że kwas alginowy występujący w owocni zielonych owoców *Embllica officinalis* działa wybitnie hamująco na infekcyjność wirusa X *in vitro*. Przebadali oni ten związek w kilku koncentracjach i stwierdzili, że hamowanie infekcyjności wirusa X wahało się od 95 do 100<sup>0</sup>%. Inne związki występujące w tej roślinie, jak np. kwas gallusowy, powodowały hamowanie infekcji wirusem X od 11,7 do 27,9<sup>0</sup>%, a kwas askorbinowy w niskich stężeniach (0,02<sup>0</sup>%) stymulował proces infekcji wirusem X, natomiast przy koncentracji 0,06<sup>0</sup>% wykazywał słabe działanie hamujące, wynoszące zaledwie 2,6<sup>0</sup>%.

Błaszczak, Ross i Larson [11] przebadali 26 gatunków, względnie odmian roślin, często stosowanych w badaniach wirusologicznych i w kilku z nich stwierdzili obecność związków hamujących infekcję wirusem X ziemniaka. Zakaźność wirusa X była całkowicie stłumiona (100<sup>0</sup>% hamowania) przez soki *Pelargonium hortorum* Bailey, *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Chenopodium album* L. i *Capsicum frutescens* L. Z dalszych obserwacji wynika, że soki tych roślin miały zdolność hamowania infekcji wirusowej nawet w wypadku ich dziesięciokrotnego rozcieńczenia wodą destylowaną; natomiast po rozcieńczeniu soków pozostałych gatunków roślin nie stwierdzono już żadnych zdolności hamowania

infekcji. Ogrzewanie soków z badanych roślin przez 10 minut do 60°C usuwało hamowanie w wielu przypadkach, ale ogólnie było mniej skuteczne, aniżeli rozcieńczanie soków roślinnych wodą. Kiedy rośliny inokulowano wirusem po upływie 20 dni od momentu spryskania ich sokiem z *Pelargonium hortorum* hamowanie jeszcze było pełne pomimo upływu tak długiego czasu do chwili spryskiwania. Soki z *Chenopodium album*, *Spinacia oleacea* i *Capsicum frutescens* naniesione na liście badanych roślin zachowały jeszcze zdolność hamowania infekcji sześć do siedmiu dni po tym zabiegu. Koncentracja czynnika powodującego hamowanie infekcji wirusa była wyższa w młodszych liściach wierzchołkowych niż w starszych. Soki wielu przebadanych gatunków zachowały pełne działanie hamujące po kilkudniowym przechowywaniu w temperaturze około 4°C.

Hooker i Kim [26] zajmowali się inhibitorami wirusa X ziemniaka pochodzącymi z ekstraktów liści kilku odmian ziemniaka *Solanum tuberosum* L. o różnej tendencji w stosunku do tego wirusa. Ekstrakty z liści ziemniaków zmieszane z oczyszczonym preparatem wirusa X powodowały obniżenie jego infekcyjności już po upływie jednej minuty od momentu wymieszania oczyszczonego preparatu wirusa X z sokiem wyciśniętym z liści ziemniaków. Zjawisko to występowało wówczas, kiedy sok był wymieszany z PVX przed zakażeniem, albo kiedy sok był naniesiony na liście *Gomphrena globosa* przed inokulacją. Jeśli liście *Gomphrena globosa* były inokulowane wirusem X, a następnie sokiem z liści ziemniaka wykazującym własności hamujące infekcję PVX raz spryskano powierzchnię liści *Gomphrena globosa* — wówczas liczba plamek „local lesions” nie była zmniejszona. Zastosowanie inhibitorów do powierzchni górnej względnie dolnej liścia nie wpływało na liczbę plamek. Procent hamowania wahał się od 70 do 90. Autorzy nie stwierdzili żadnych różnic zarówno ilościowych, jak i jakościowych w działaniu inhibitorów z soków liści ziemniaka o różnych typach tolerancji względem wirusa.

Köhler [37] w swoich licznych pracach nad inhibitorami wirusa X występujących w liściach ziemniaka stwierdził, że inhibitor raczej podnosi odporność gospodarza, a nie wpływa na wirusa.

Kuntz i Walker [41] stwierdzili znaczne hamowanie infekcji wirusem X ziemniaka przez działanie sokiem szpinaku. Podobne hamowanie infekcji wirusem X stwierdzili Mc Keen [47] przez soki *Capsicum frutescens* L., oraz Gendron i Kassanis [21] przez soki *Datura*.

Dijkstra i Rensen [19] badali wpływ pochodnych puryny, pirymidyny, między innymi 6-azouracylu na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniu (*in vivo*). Stwierdzili, że związki te wywierały silnie hamujący wpływ zarówno na liczbę, jak i kształt plamek „local lesions” na liściach tytoniu oraz na wyciętych z nich krążkach — zakażonych wirusem mozaiki tytoniu, albo nukleinowym kwasem TMV-RNA. Nie wykazali natomiast żadnego wpływu na infekcyjność wirusa *in vitro*.

## ROLA ALKALOIDÓW JAKO INHIBITORÓW WIRUSÓW

Ryżkow i Smirnova [59] badali wpływ różnych związków chemicznych jak również alkaloidów — efedryny, kolchicyny, kofeiny i innych — na wirus mozaiki tytoniu i nie stwierdzili widocznego wpływu. Ajzenman, Zielepucha, Drobotko i Raszba [1] przebadali własności antybakteryjne 95 alkaloidów, spośród których 41 wykazało działanie antybakteryjne.

Bobyr [12] badał wpływ alkaloidów na wirusa mozaiki tytoniu. Przebadał ponad 60 alkaloidów; z tego 9 alkaloidów hamowało tworzenie się nekroz od 33 do 92<sup>0</sup>%. Najbardziej aktywnymi spośród nich okazały się diuretyna, chlorowodorek chininy i lykopydina (73-92<sup>0</sup>% hamowania nekroz wirusowych). Mniej efektywne okazały się: matryna, chlorowodorek salsoliny i chelirytryna (46-54<sup>0</sup>%). Wszystkie te alkaloidy okazały się inhibitorami infekcji. Liście badanych roślin były traktowane alkaloidami w momencie ich inokulacji wirusem mozaiki tytoniu. Żaden z badanych alkaloidów nie wykazywał widocznego wpływu hamującego, jeżeli liście traktowano nimi po upływie 24 godzin od chwili inokulacji wirusem.

Schlegel i Rawlins [60] badali wpływ wielu związków organicznych, między innymi alkaloidów, na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniu. Stwierdzili oni, że efedryna i chinina wykazują słaby wpływ stymulujący na namnażanie się TMV, natomiast kolchicina hamowała (w przybliżeniu o 25<sup>0</sup>%) rozwój tego wirusa. Schneider [61] przebadał w tym samym aspekcie wiele innych związków chemicznych, a także alkaloidy: kofeinę, teofilinę i teobrominę. Wykazał on, że wpływ tych alkaloidów na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniu był lekko hamujący, albo też stymulujący. W wypadku kofeiny i teofiliny zależało to od koncentracji tych związków w badanym roztworze. Gubański [23, 24] obserwując wpływ wyciągów ze sporyszu na wirusa mozaiki tytoniu stwierdził, że alkaloidy sporyszu nie posiadają własności antywirusowych.

Oprócz prac nad działaniem alkaloidów na namnażanie się wirusów roślinnych nie można pominąć bardzo ważnych prac, które dotyczą działania hamującego niektórych alkaloidów na nowotwory. Należy to podkreślić tym bardziej dziś, kiedy badacze w licznych ośrodkach całego świata stwierdzają niezbicie, że pewne nowotwory są pochodzenia wirusowego.

Alkaloidy występujące w *Vinca rosea* (Linn) — winkrystyna, winblastyna, winleurosyna — według licznych prac Creasey'a [13, 14, 15, 16] oraz Noble'a [50, 51] wykazują własności antynowotworowe przy niektórych typach białaczki. Alkaloidy te wydają się hamować działanie RNA polymerazy, ale przy stosunkowo wysokim ich poziomie. Winkrystyna wydaje się rokować nadzieję przedłużenia życia w wypadku białaczki u dzieci.

Kupchan [42] podkreśla znaczenie  $\beta$ -solamariny alkaloidu występującego w *Solanum dulcamara* o strukturze steroido-glikozydowej, wyka-

zującej działanie antynowotworowe względem *Sarcoma* 180 u myszy. Kupchan [43] w swoich licznych pracach wspomina też o innych związkach tego typu, jak np. telikarpina oraz tetrandina wykazujących działanie hamujące względem *carcinosarcoma* 256 u szczurów.

Alkaloidy były badane również z punktu widzenia ich działania hamującego na rozwój niektórych grzybów. Gäuman [20] stwierdził, że solanina i tomatyna hamują wzrost *Fusarium lycopersici* w rozcieńczeniu  $1:10^{-5}$ , tj. w stężeniu naturalnie występującym w roślinach.

Allen i Kuć [2, 39, 3] uzyskali podobne wyniki badając wpływ na mikroorganizmy szakoniny i solaniny w powiązaniu z kwasem chlorogenowym. Autorzy ci stwierdzili również, że steroidowe glikoalkaloidy obecne w ekstraktach ze skórki ziemniaka były wysoko toksyczne wobec *Helminthosporium carbonum*.

Arneson i Durbin [5] sugerują, że mechanizm działania alkaloidu tomatyny, toksycznego wobec pewnych mikroorganizmów może polegać na tworzeniu kompleksów ze związkami sterydowymi grzybów.

Sinden, Goth, O'Brien [69] stwierdzili, że solanina, szakonina i solanidyna hamują wzrost *Alternaria solani*. Najsilniejsze własności hamujące na wzrost tego grzyba wykazała solanidyna.

#### METODY BADAŃ HAMOWANIA ROZWOJU WIRUSA

Znanych jest kilka metod określenia działania danej substancji na wirusa; w zasadzie każda z tych metod sprowadza się do oznaczenia ilości wirusa w tkance roślinnej poddanej działaniu badanej substancji i kontroli (bez dodatku substancji).

Metody biologiczne, proste i łatwe w użyciu, niejednokrotnie dają odpowiedź na pytanie, które stawia sobie eksperymentator. Najprostsza metoda opiera się na liczeniu plamek typu chlorotycznego czy nekrotycznego, które występują w roślinie (najczęściej na liściach) po zakażeniu wirusem danej rośliny. Jeżeli bada się wpływ jakiejś substancji czy to pochodzenia naturalnego, czy też sztucznego, można badać jej działanie stymulujące lub też hamujące w czasie infekcji, względnie po upływie pewnego czasu (często 24 godziny po inokulacji). Kiedy bada się wpływ danej substancji jako inhibitora, czy stymulatora infekcji, wprowadza się ją do rośliny równocześnie z wirusem w momencie inokulacji (inokuluje się np. połówki liści — jedną połowę traktuje się jako kontrolę, drugą jako testową (wirus + substancja badana). Chcąc badać działanie danej substancji jako inhibitora czy stymulatora namnażania się wirusa wprowadza się ją do rośliny zazwyczaj po 24 godzinach od momentu inokulacji. Liście czy też krążki wycięte z nich, zakażone 24 godziny wcześniej, umieszcza się na odpowiednich pożywkach z dodatkiem i bez badanej substancji. Po upływie kilku dni zakaża się rośliny testowe

ekstraktami sporządzonymi z tych liści czy krążków i notuje liczbę plamek otrzymanych w kontroli i teście.

Można też badać wpływ działania danej substancji na wirusy oczyszczone, tj. wyekstrahowane z komórki roślinnej. Ekstrakcji dokonuje się przy pomocy różnorodnych metod biochemicznych, które w większości wypadków są dość skomplikowane, wymagają już pewnej aparatury, a przede wszystkim wirówki szybkoobrotowej i dobrego spektrofotometru. Polegają one na wyekstrahowaniu wirusa — nukleoproteidu czy też wirusowego kwasu nukleinowego za pomocą odpowiednich związków chemicznych, wirowaniu i oznaczeniu ilościowym w spektrofotometrze na podstawie pochłaniania — absorpcji — w świetle ultrafioletowym przy długości fali 260  $m\mu$ . Poszczególni badacze jak Schneider [69], Kutsy i Rowlins [44], Shimomoura [59], Bancroft i Curtis [6] przygotowywali różnymi sposobami homogenizat tkankowy i ekstrahowali do oznaczeń ilościowych albo wirus jako nukleoproteid w całości (Schneider), albo wirusowy kwas nukleinowy po hydrolizie kwasem nadchlorowym.

Białko wirusowe można również oznaczyć ilościowo w kolorymetrze stosując odczyn barwy Folina (Hirai [25] i Potty [55]).

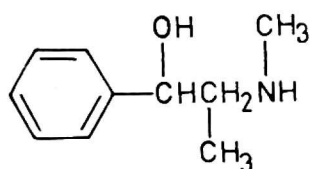
## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

### CEL PRACY

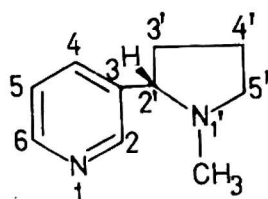
Celem pracy było przebadanie wpływu efedryny, nikotyny i nornikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka w liściach tytoniu *in vivo* (jako inhibitorów namnażania się wirusa) i *in vitro* (jako inhibitorów infekcji).

Efedryna, która była przedmiotem badań jest typem alkaloidu tzw. protoalkaloidu, u którego atom azotu nie jest wcielony w heterocykliczny szkielet, lecz wbudowany do bocznego łańcucha, podobnie jak u aminokwasów alifatycznych. Protoalkaloidy są uważane za pochodne aminokwasów.

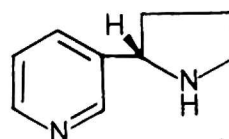
Do badań nad wpływem namnażania się wirusa X ziemniaka wybrano dwa alkaloidy — efedrynę alkaloid nietytoniowy występujący w roślinie *Ephedra distachia* (przensil), oraz nikotynę — główny przedstawiciel alkaloidów tytoniowych z typowo wbudowanym azotem do heterocyklicznego pierścienia, czym charakteryzują się w większości alkaloidy.



Efedryna



Nikotyna



Nornikotyna

W literaturze nie znaleziono pracy rozpatrującej działanie alkaloidu nikotyny na wirusy roślinne.

## MATERIAŁ ROŚLINNY

Doświadczenia przeprowadzano na roślinach tytoniu *Nicotiana tabacum* L. odmiana White Burley, Xanthi, Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux. Jako rośliny testowe dla wirusa X ziemniaka stosowano: *Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. Badania prowadzono również na mieszańcu tytoniu w obrębie gatunku *Nicotiana tabacum* pochodzącym ze skrzyżowania generatywnego Ambalema Bergerac × Ambalema Gembloux. Rośliny tytoniu używane do badań w tej pracy były przeważnie w stadium 8-10 liści. Rośliny *Gomphrena globosa* L. miały zazwyczaj rozwinięte trzy piętra liści, a rośliny *Chenopodium amaranticolor* posiadały 8-10 liści. Wszystkie badane rośliny hodowano w szklarni w doniczkach ze sterylizowaną ziemią. W skład ziemi używanej do doświadczeń wchodziły 2 części kompostu dobrze przesianego, 1 część miału torfowego i 1 część piasku. Do badań używano rośliny zdrowe i zakażone wirusem X ziemniaka. Wirus X ziemniaka pochodził z ziemniaków uprawianych pod Krakowem, a następnie był utrzymywany wiele lat w Pracowni Wirusologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN przez zakażanie coraz to nowych partii roślin tytoniu. Materiał wirusa X stosowany do zakażenia roślin był również dostarczany z Instytutu Ziemniaka z Młochowa. Najlepsza do rozmnażania wirusa X ziemniaka jest odmiana tytoniu White Burley ze względu na intensywne namnażanie się w nim wirusa X ziemniaka. Wirus X ziemniaka był szczepem nekrotycznym, powodującym na zakażonych liściach tytoniu White Burley — plamki chlorotyczno-nekrotyczne, a na liściach później wyrastających z tzw. objawami wtórnymi — silną mozaikę.

Tytoń zakażano klasyczną metodą, posypując liście przeznaczone do zakażenia karborundem. Następnie przy pomocy małego pędzla pocierano liście sokiem wciśniętym z zakażonych wirusem X liści tytoniu, względnie oczyszczonym preparatem wirusa X ziemniaka, albo też rozpuszczonym w odpowiedniej ilości wody zliofilizowanym proszkiem, otrzymanym z liści zakażonych wirusem X. Objawy zakażenia po inokulacji X zostały opisane szczegółowo w pracy autorki [27].

Jest rzeczą znaną, że objawy porażenia wirusem X zmieniają się w zależności od odmiany, która została zakażona. Niektóre odmiany tytoniu, jak np. wspomniana White Burley, reagują na wirus X ziemniaka zarówno lokalnie (liście zakażone), jak i nekrotyczno-chlorotyczną mozaiką na całej blaszce liściowej. Inne rośliny, jak np. *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* i *Chenopodium urbicum* reagują na zakażenie wirusem X lokalnie, tworząc bardzo wyraźne plamki, łatwe do policzenia, stąd są używane jako rośliny do testów biologicznych (na podstawie liczby plamek można sądzić o ilości udanych infekcji i o stopniu namnażania się wirusa).

## METODY BADAWCZE

Metoda testu biologicznego (*in vivo*). Metoda testów biologicznych była najczęściej stosowana w tej pracy. Przy badaniu hamującego wpływu alkaloidów na namnażanie się wirusa X ziemniaka *in vivo* przebieg doświadczenia był następujący: liście tytoniu odmiany White Burley lub Xanthi zakażono wirusem X. Po upływie 24 godzin od momentu inokulacji z zakażonych liści tytoniu wycinano krążki o średnicy 12 mm za pomocą korkoboru i umieszczano je w szalkach Petriego na powierzchni płynu pożywki z dodatkiem alkaloidu o różnych koncentracjach. Kontrolę stanowiły krążki trzymane na powierzchni płynu z pożywką bez dodatku alkaloidów. Pożywka miała następujący skład: 20 g sacharozy, 0,2 g fosforanu wapnia jednozasadowego oraz 0,3 g sulfanilamidu w 1000 ml wody destylowanej. Krążki trzymano na pożywkach przez 4 dni, przy czym pożywki codziennie wymieniano na świeże. Szalki Petriego trzymano w komorach oświetlonych światłem sztucznym o natężeniu około 2000 lx i temperaturze 19-22°C. Po upływie 4 dni krążki przemywano dokładnie wodą destylowaną, osuszano na bibule filtracyjnej i wyciskano z nich sok. Sok ten odwirowywano przy 3500 obr/min przez okres 20 minut i rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1 : 5 (rozcieńczenie soku w tym stosunku jest korzystne przy inokulacji roślin testowych wirusem X ziemniaka; otrzymuje się wówczas odpowiednią liczbę plamek, co stwierdzono już w poprzednich badaniach). Tak przygotowanym inokulatem zakażono najmniej 20 roślin testowych. W przypadku *Nicotiana tabacum* i *C. amaranticolor* stosowano metodę zakażenia połówek liściowych, tzn. jedną połówkę inokulowano sokiem wyciśniętym z krążków trzymanych na pożywce z dodatkiem alkaloidów, a drugą, sokiem z krążków z pożywki kontrolnej. Natomiast w doświadczeniach z *G. globosa* zakażano liście na kilku piętach. Na danym piętrze (licząc zawsze od nasady rośliny) inokulowano jeden liść sokiem z krążków trzymanych na pożywce z alkaloidem, a naprzeciwległy sokiem z krążków kontrolnych. Na liściach tytoniu liczono plamki (local lesions) na obu połówkach oddzielnie po upływie 4 do 5 dni w świetle lampy UV [38], względnie w świetle dziennym. Charakterystyczne, wyraźne i otoczone czerwoną obwódką plamki na *Gomphrena globosa* liczono w świetle dziennym po upływie 6—8 dni od chwili inokulacji. Średni procent hamowania infekcyjności wirusa obliczono wg wzoru Uteha i Johnsona [69].

Metoda testu biologicznego (*in vitro*). Przy badaniu hamującego wpływu alkaloidów *in vitro* jako inhibitorów infekcji wirusem X ziemniaka przebieg doświadczenia był następujący: oczyszczony preparat wirusa X ziemniaka (według metody Corbetta [17] w postaci koloidalnego płynu był zmieszany z odpowiednią ilością alkaloidu. Następnie tak przygotowane próbki trzymano w zamkniętych naczyniach szklanych w lodówce o tem-



peraturze około 4°C przez 96 godzin, albo w kamerach oświetlonych sztucznym światłem około 2000 lx przez 96 godzin w temperaturze 19-20°C. Kontrolę stanowiły próbki wirusa X ziemniaka bez dodatku alkaloidu, trzymane w tych samych warunkach w lodówce lub na świetle. Po upływie 4 dni (podobnie jak w wypadku badań *in vivo*) zakazono roztworem testowym (z dodatkiem alkaloidu) i roztworem kontrolnym (bez alkaloidu) — rośliny *Gomphrena globosa*. Roztwór wirusa zarówno testowy, jak i kontrolny rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku: 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 30 oraz 1 : 40. Liczbę plamek notowano tak samo jak w wypadku testu biologicznego *in vivo*, tj. po upływie 6-8 dni od momentu inokulacji.

Metody biochemiczne. Za pomocą metod biochemicznych oznaczano zawartość wirusa X ziemniaka w materiale roślinnym. Stosowano kilka metod. Materiał roślinny przeznaczony do badań przechowywano w zamrażarce w temperaturze -15°C. Pochodził on z liści tytoniu, z których wycinano krążki przy pomocy korkoboru, umieszczano je w szalkach Petriego i w zamrażarce.

Jako pierwszą stosowano metodę Schneidera [62], za pomocą której można oznaczyć zawartość wirusa jako nukleoproteid. Zamrożone krążki, uprzednio wycięte z liści tytoniu rozcierano w moździerzu z dodatkiem buforu fosforanowego (pH = 6) w rozcieńczeniu 1 : 10 w stosunku do ciężaru świeżego materiału roślinnego. Następnie przenoszono homogenizat do próbek, dodawano 2 ml chloroformu, 1 ml alkoholu izoamyloвого i wytrząsano przez 15 minut zamykając próbki korkami. Potem pozostawiono próbki w lodówce w temperaturze około 4°C na okres 20 minut i wirowano w wirówce typu Sorvall (4000 obr/min) przez 15 minut. Po odwirowaniu odciągano pipetą warstwę wodną, a warstwę chloroformową odrzucano. Pobrane 2 ml fazy wodnej wirowano przez godzinę w wirówce szybkoobrotowej typu Spinco (37 000 obr/min). Po odwirowaniu supernatant odrzucano, a osad zalewano 1 ml buforu fosforanowego o pH = 7 i pozostawiono przez noc w lodówce o temperaturze 4°C. Następnego dnia osad z buforem fosforanowym wytrząsano przez jedną godzinę na wytrząsarce, dodawano 2 ml buforu fosforanowego do każdej próbki, w końcu odwirowywano przy 10000 obr/min. W supernatancie oznaczano zawartość wirusa za pomocą spektrofotometru w świetle UV sporządzając widmo absorpcyjne w zakresie fali od 210 do 300 m $\mu$ .

Koncentrację wirusa X można obliczyć według Bawdena i Kleczkowskiego [8], wiedząc, że przy koncentracji wirusa X ziemniaka równej 0,255 g/l-ekstynkcja przy długości fali równej  $E_{260} = 0,88$ .

Do oznaczeń zawartości wirusa X w materiale roślinnym stosowano również metodę Bancrofta [6]. Materiał roślinny był przygotowany tak, jak w metodzie Schneidera [69]. Do homogenizatów roślinnych w próbkach dodawano chloroform, wytrząsano 5 minut, a następnie wirowa-

no przez 15 minut przy 4000 obr/min. Do supernatantu w ilości 4 ml dodawano 2 ml 2M kwasu trójchlorooctowego. W wypadku próbek zawierających wirus wytrąca się biały osad, natomiast w kontrolnych nie powinno być żadnego osadu. Następnie próbki pozostawiono przez kilka minut w spokoju, po czym wirowano przez 5 minut przy 4000 obr/min. Po odwirowaniu supernatant odrzucano, a do osadu dodawano 6 ml 0,3 M kwasu trójchlorooctowego i przeprowadzano hydrolizę w temperaturze 90°C przez 15 minut. Po oziębieniu hydrolizaty uwalniano od osadów przez przesączenie na bibule Whatmann Nr 1 i następnie oznaczano w nich zawartość wirusa przy pomocy spektrofotometru.

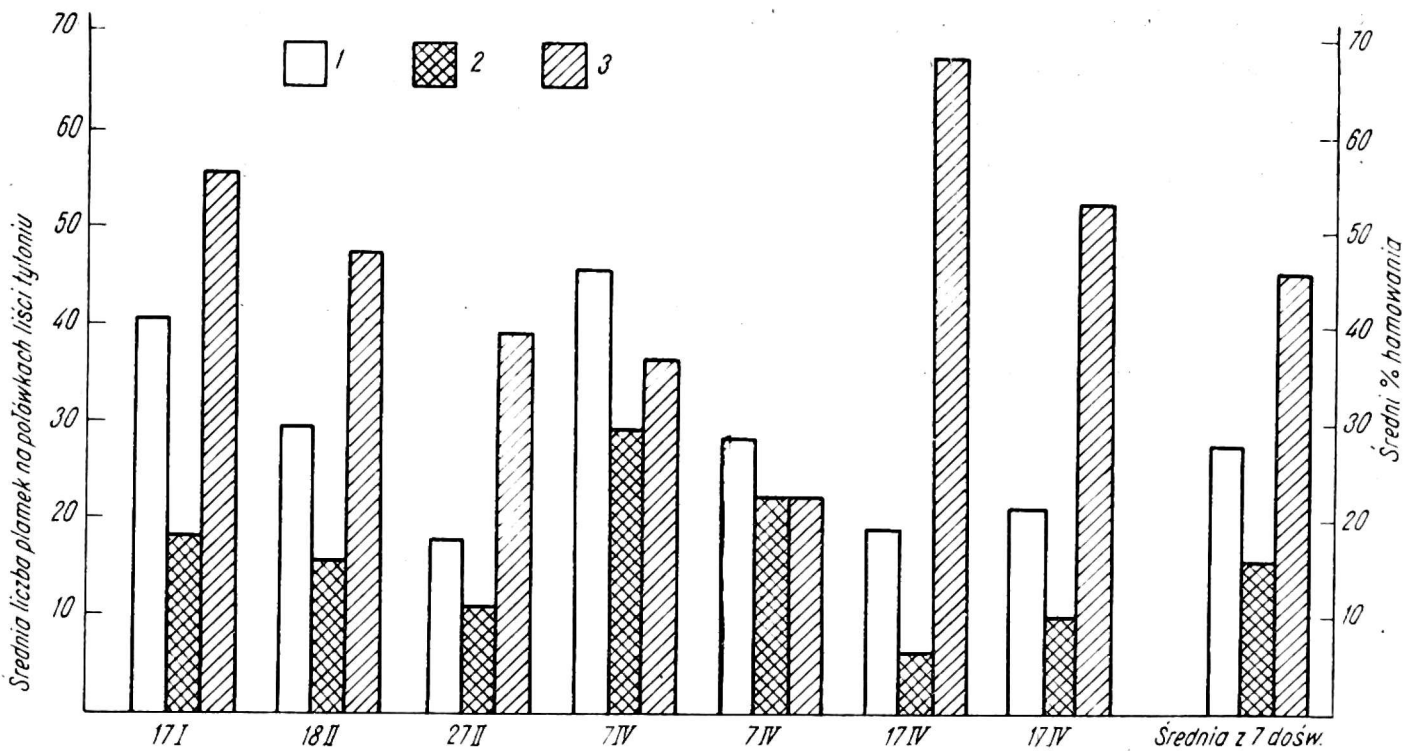
Innym sposobem oznaczania wirusa jako wirusowego kwasu nukleinowego była metoda Shimomura [59]. Zamrożone krążki wycięte uprzednio z liści tytoniu miażdżono w móżdżerze z dodatkiem wody destylowanej (10-krotna objętość wody destylowanej w stosunku do ciężaru świeżych krążków liściowych). Homogenizaty przelewano do próbek, dodawano 2 ml chloroformu, wytrząsano 10 minut, oziębiano w temperaturze -20°C i pozostawiono przez noc. Po odmrożeniu homogenizatów wirowano je przez 15 minut przy 4000 obr/min. Następnie pobierano 4 ml supernatantu do innych próbek i dodawano do każdej próbki 4 ml 1 M kwasu nadchlorowego. Próbki pozostawiano w spokoju przez 5 minut, wirowano 10 minut przy 4000 obr/min. Supernatanty dekantowano i dodawano do każdej próbki 5 ml 0,5 M kwasu nadchlorowego, po czym przeprowadzano hydrolizę przez 15 minut w 90°C na łaźni wodnej. Po hydrolizie próbki oziębiano, odwirowywano przy 4000 obr/min i mierzono w spektrofotomerze jak w dwóch uprzednio podanych metodach. Obliczenie koncentracji wirusa X ziemniaka na podstawie współczynnika ekstynkcji przy 260 m $\mu$  dla kwasu nukleinowego jest znacznie trudniejsze. Niektórzy autorzy, jak np. Shimomura, podają wysokość ekstynkcji przy 260 m $\mu$  dla kontroli i wirusowego kwasu nukleinowego mozaiki tytoniu; na podstawie tych danych można wnioskować w przybliżeniu o zawartości wirusa w próbce badanej.

#### PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ

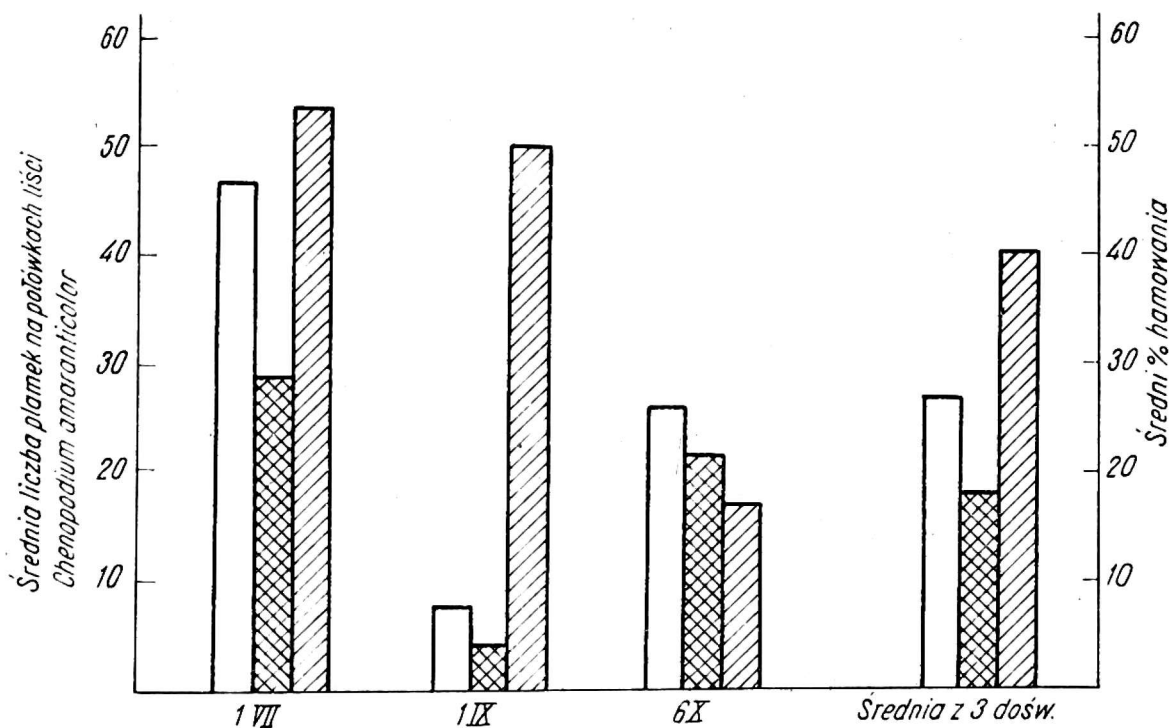
Wpływ efedryny na namnażanie się wirusa X (*in vivo*). Wpływ efedryny na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) badano w kilku koncentracjach alkaloidu: 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 oraz 0,01%.

Z przedstawionego graficznie wpływu hamującego (rys. 1) efedryny na namnażanie się wirusa X można zauważyć że liczba plamek otrzymanych po inokulacji wirusem z dodatkiem efedryny jest zawsze niższa niż w kontroli. Średnia z 7 doświadczeń dla hamowania wyniosła 45,9%.

Rysunek 2 przedstawia wyniki podobnych doświadczeń jak rysunek 1,



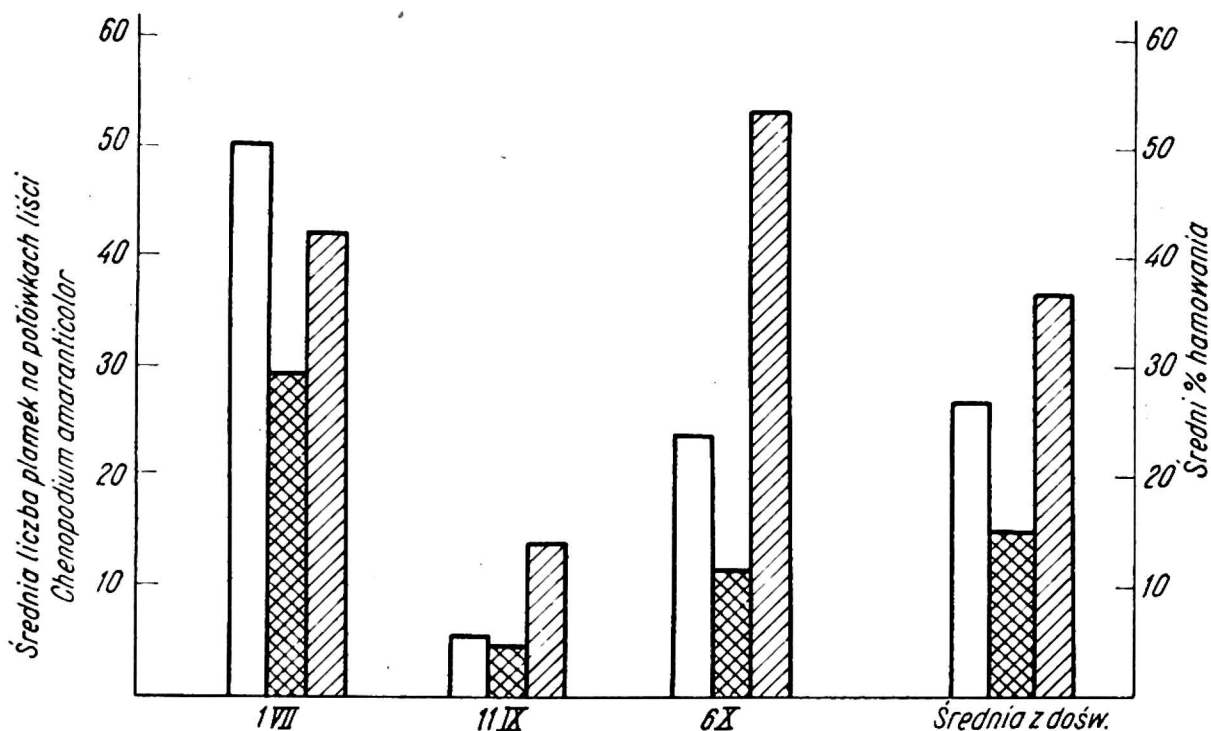
Rys. 1. Wpływ efedryny (0,05%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w tytoniu odmiany White Burley 1 — średnia liczba plamek w kontroli bez efedryny, 2 — średnia liczba plamek w teście z efedryną, 3 — średni procent hamowania



Rys. 2. Wpływ efedryny (0,2%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Chenopodium amaranticolor*. Objasnienia jak na rysunku 1

z tą różnicą, że koncentracja efedryny była wyższa, bo 0,2% i testowano liczbę plamek na połówkach liści *Chenopodium amaranticolor*, a nie na liściach tytoniu. Średnia z 3 doświadczeń dla hamowania wyniosła 40%, a więc była mniejsza niż w poprzednim doświadczeniu, mimo że koncen-

tracja alkaloidu była większa. Wpłynęły na to wyniki doświadczenia z 6 października, w którym różnica między liczbą plamek w kontroli i w teście była znikoma. Wy tłumaczenie tego zjawiska jest rzeczą trudną; nasuwa się przypuszczenie, że w późniejszych miesiącach jesiennych metabolizm u roślin przebiega znacznie wolniej i stąd może następować słabsze porażenie roślin wirusem. Ponadto nie powinno się porównywać procentu hamowania na rysunkach 1 i 2-im, gdyż liczbę plamek po inokulacji testowano na dwóch różnych roślinach.

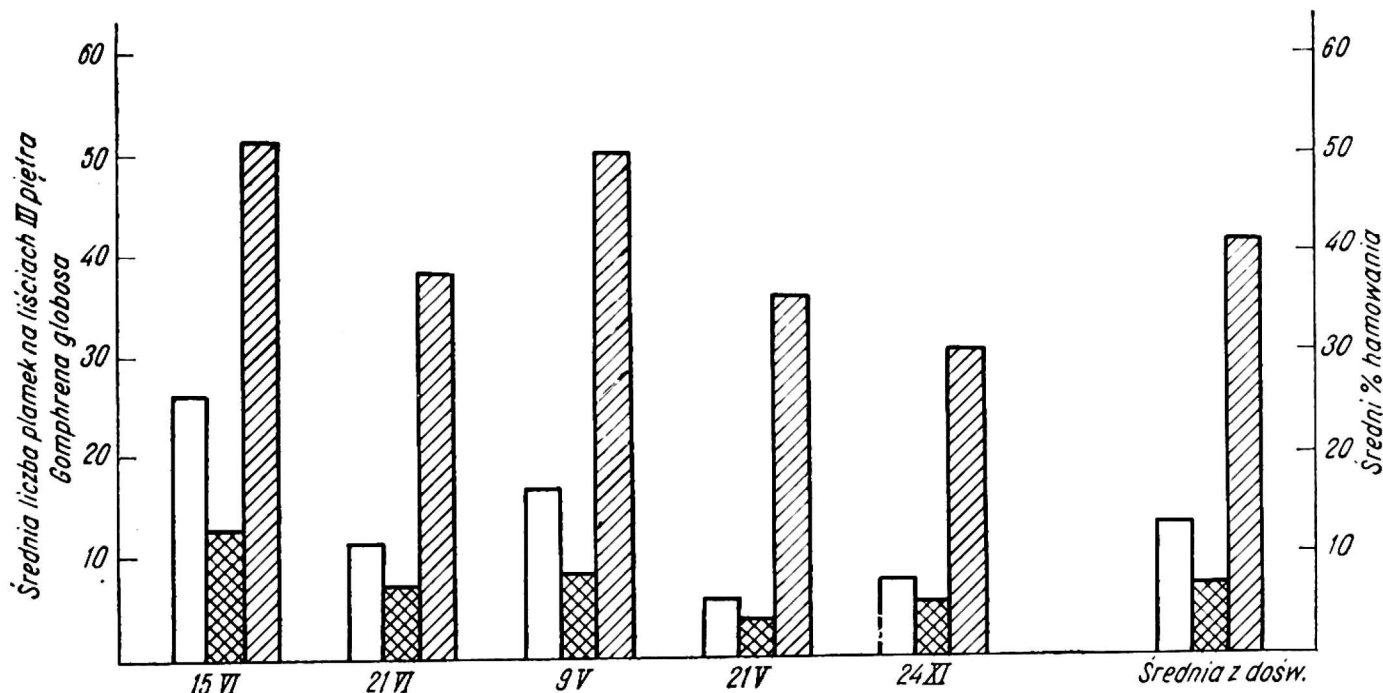


Rys. 3. Wpływ efedryny (0,02%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Chenopodium amaranticolor*. Objaśnienia jak na rysunku 1

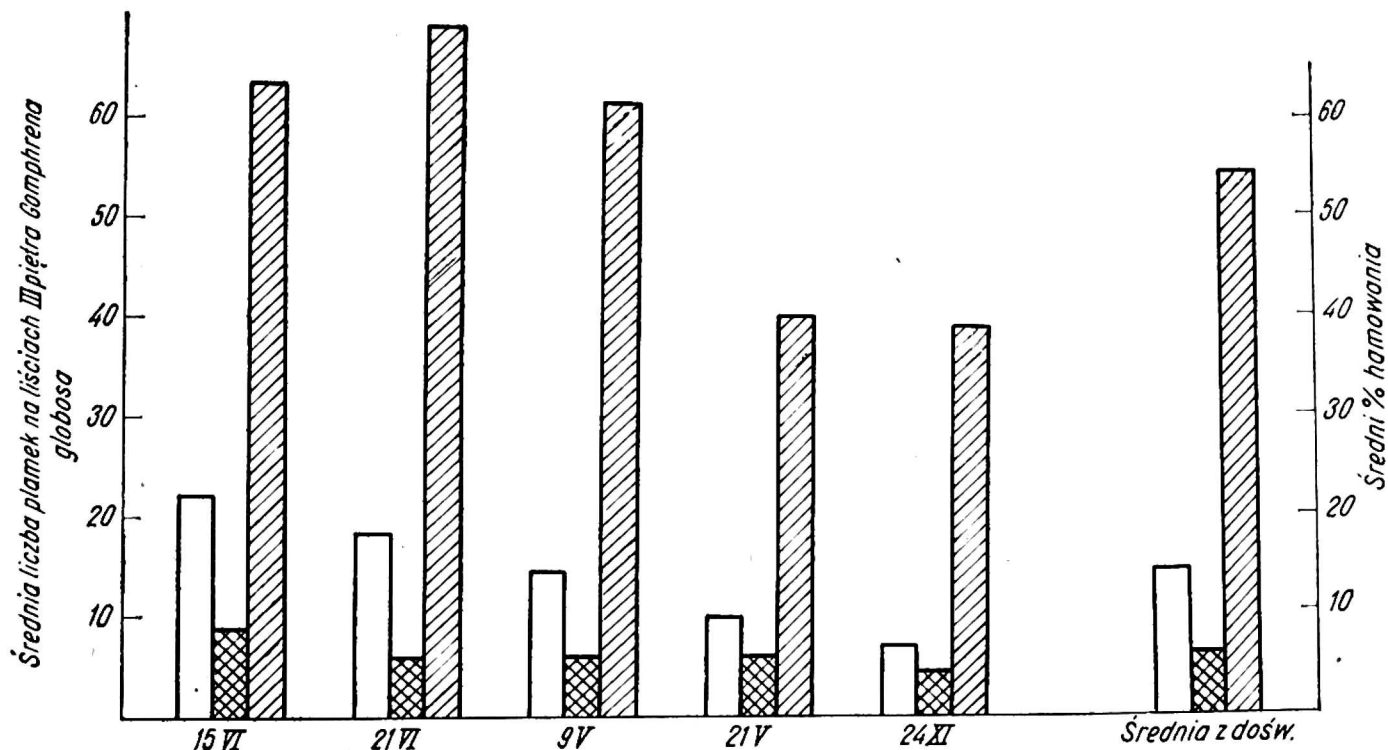
Rysunek 3 przedstawia wyniki dotyczące badania wpływu efedryny o koncentracji 0,02% na namnażanie się wirusa X. W doświadczeniu przeprowadzonym jesienią hamowanie wyniosło tylko 14,2%. Z rysunku widać, że liczba plamek otrzymanych po inokulacji wirusem z efedryną była mniejsza niż liczba plamek otrzymanych po zakażeniu wirusem bez dodatku alkaloidu.

Rysunek 4 przedstawia wpływ alkaloidu efedryny o stężeniu 0,1% na wirus X. Średnia generalna hamowania jest wysoka, bo wynosi 54,5%. Podobnie jak i poprzednio zauważono, że w doświadczeniu przeprowadzonym w listopadzie procent hamowania jest niższy.

Rysunek 5 przedstawia podobne doświadczenia jak rysunek 4, z tą różnicą, że koncentracja efedryny była tu dziesięciokrotnie niższa, tj. wynosiła 0,01%. Średnia generalna hamowania była niższa jak poprzednio i wynosiła 41,1%. Znowu należy podkreślić, że w doświadczeniu przeprowadzonym w listopadzie średni procent hamowania był najniższy w porównaniu z badaniami przeprowadzonymi w innym terminie.

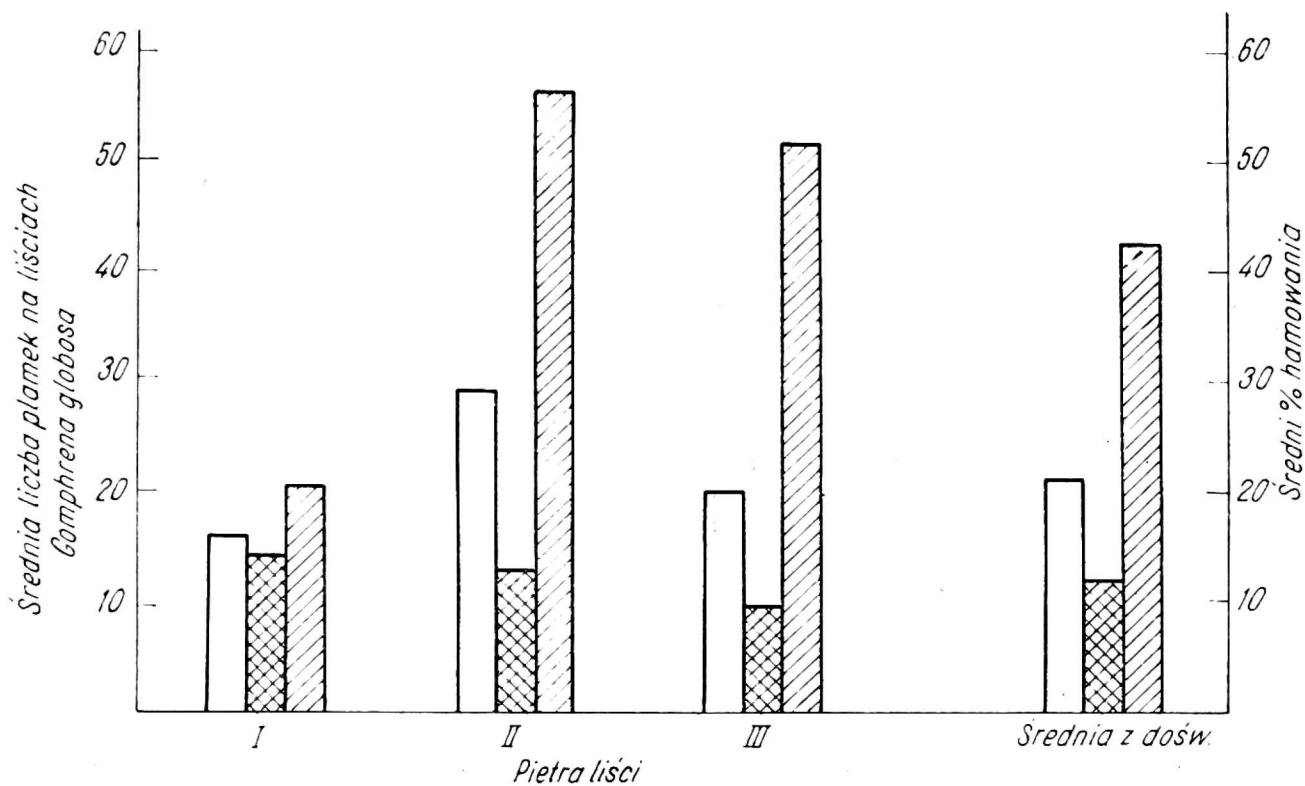


Rys. 4. Wpływ efedryny 0,1% na namnażanie się wirusa X ziemniaka (in vivo) w *Gomphrena Globosa*. Objaśnienia jak na rysunku 1.

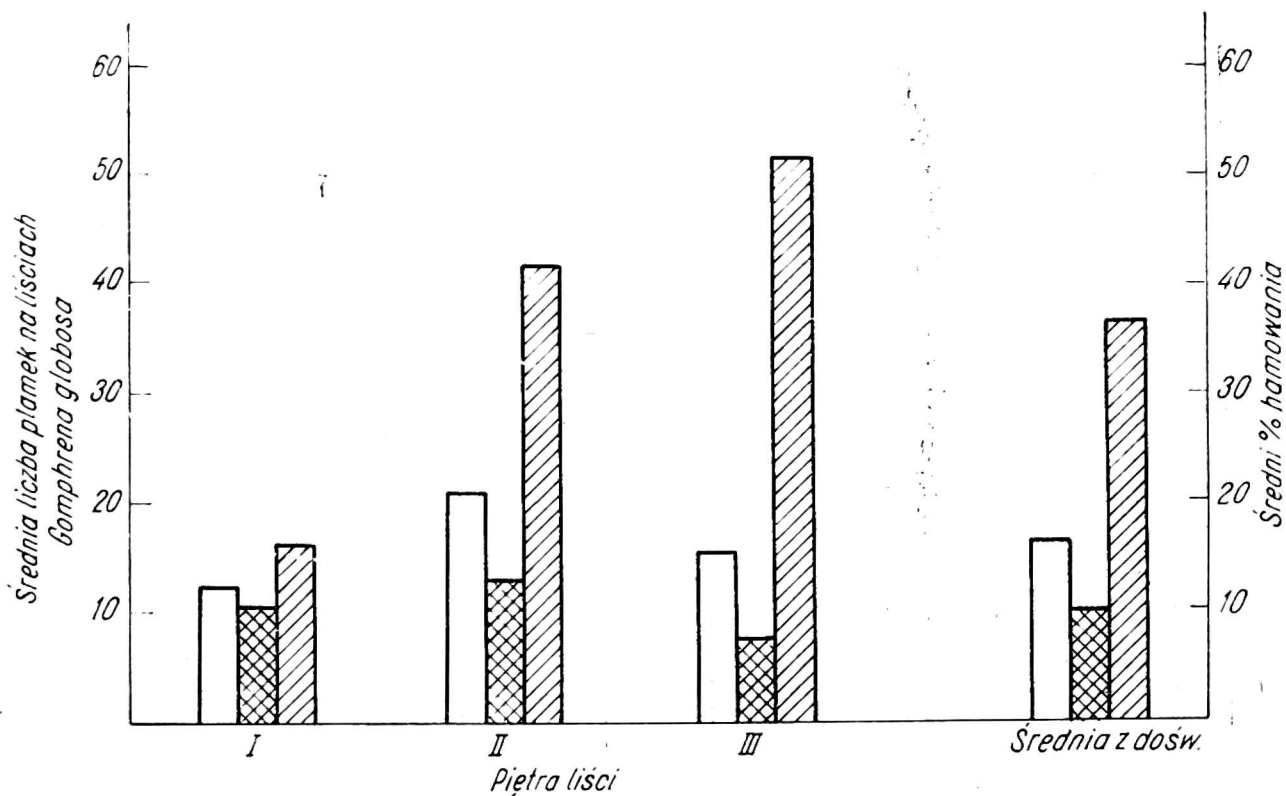


Rys. 5. Wpływ efedryny (0,01%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (in vivo) w *Gomphrena globosa*. Objaśnienia jak na rysunku 1

Rysunek 6 przedstawia wyniki doświadczeń nad wpływem efedryny na namnażanie się wirusa X ziemniaka przeprowadzone na liściach I, II i III piętra rośliny *Gomphrena globosa*. Koncentracja zastosowanej tu efedryny wynosiła 0,2%. Najmniejszą liczbę plam jak również najniższy procent hamowania otrzymano na liściach I piętra.



Rys. 6. Wpływ efedryny (0,2%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Gomphrena globosa*. Objasnienia jak na rysunku 1

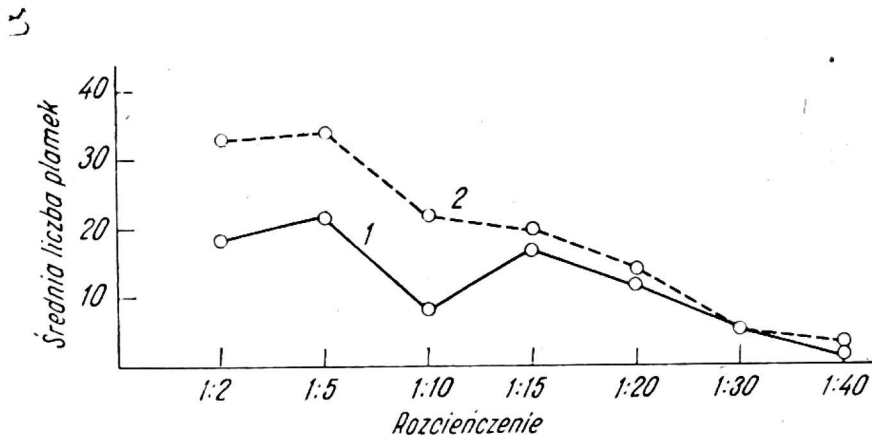


Rys. 7. Wpływ efedryny (0,02%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Gomphrena globosa*. Objasnienia jak na rysunku 1

Rysunek 7 przedstawia podobne doświadczenie jak rysunek 6, z tym że koncentracja efedryny była dziesięciokrotnie niższa, i wynosiła 0,02%. Najslabsze hamowanie można zauważyć na liściach I piętra *Gomphrena globosa* (najniższe). Średnia generalna hamowania wynosi 36,5% przy zastosowaniu efedryny o koncentracji 0,02%, a 42,6% przy stężeniu alkaloidu 0,2%. Z omówionych wykresów można zauważyć wyraźną tenden-

cję do silniejszego hamowania namnażania się wirusa X przy wyższej koncentracji alkaloidu. Istnieje więc prosta zależność między hamującym wpływem alkaloidu efedryny na rozwój wirusa X a koncentracją zastosowanego tu inhibitora.

Wpływ nikotyny na namnażanie się wirusa X (*in vivo*). Badano również wpływ alkaloidu nikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka *in vivo* w kilku koncentracjach alkaloidu: 0,2, 0,05, 0,04 i 0,01<sup>0</sup>/. W doświadczeniach zastosowano takie same metody jak przy badaniu efedryną.

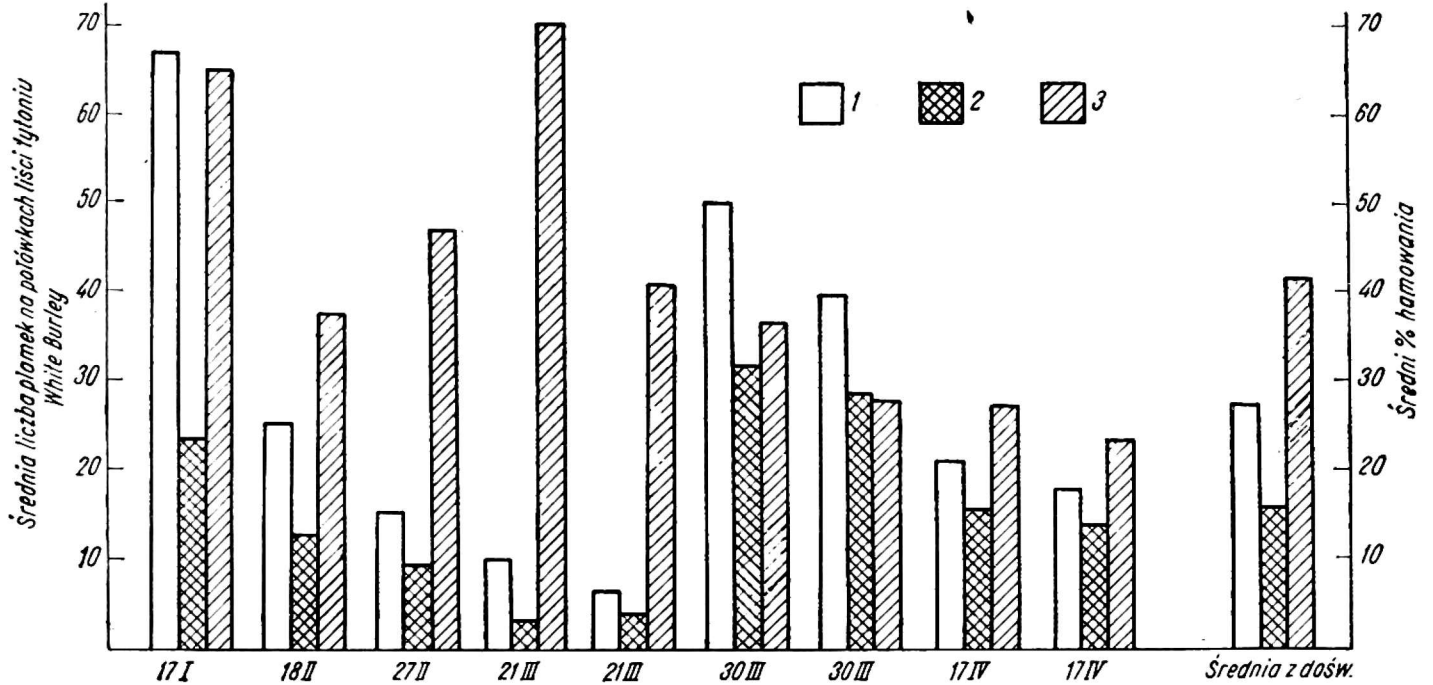


Rys. 8. Działanie nikotyny (0,05<sup>0</sup>%) na wirus X ziemniaka (*in vivo*) w *Gomphrena Globosa*

1 — test, 2 — kontrola

Rysunek 8 przedstawia wyniki doświadczenia nad wpływem nikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka *in vivo*. W doświadczeniu tym sok wyciśnięty z krążków liści tytoniu trzymanych na pożywce kontrolnej i testowej rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20, 1 : 30 oraz 1 : 40. Z wykresu widać że krzywa kontrolna (tj. bez dodatku nikotyny) przebiega powyżej krzywej testowej (z dodatkiem nikotyny — 0,05<sup>0</sup>%). Liczba plamek otrzymanych na liściach *Gomphrena globosa* jest niższa w wypadku inokulacji sokiem wyciśniętym z krążków liści tytoniu (gdzie zastosowano nikotyne) aniżeli bez jej dodatku. W miarę rozcieńczania soku obie krzywe równomiernie opadają, liczba plamek otrzymanych na roślinie testowej jest coraz niższa, infekcyjność wirusa X spada.

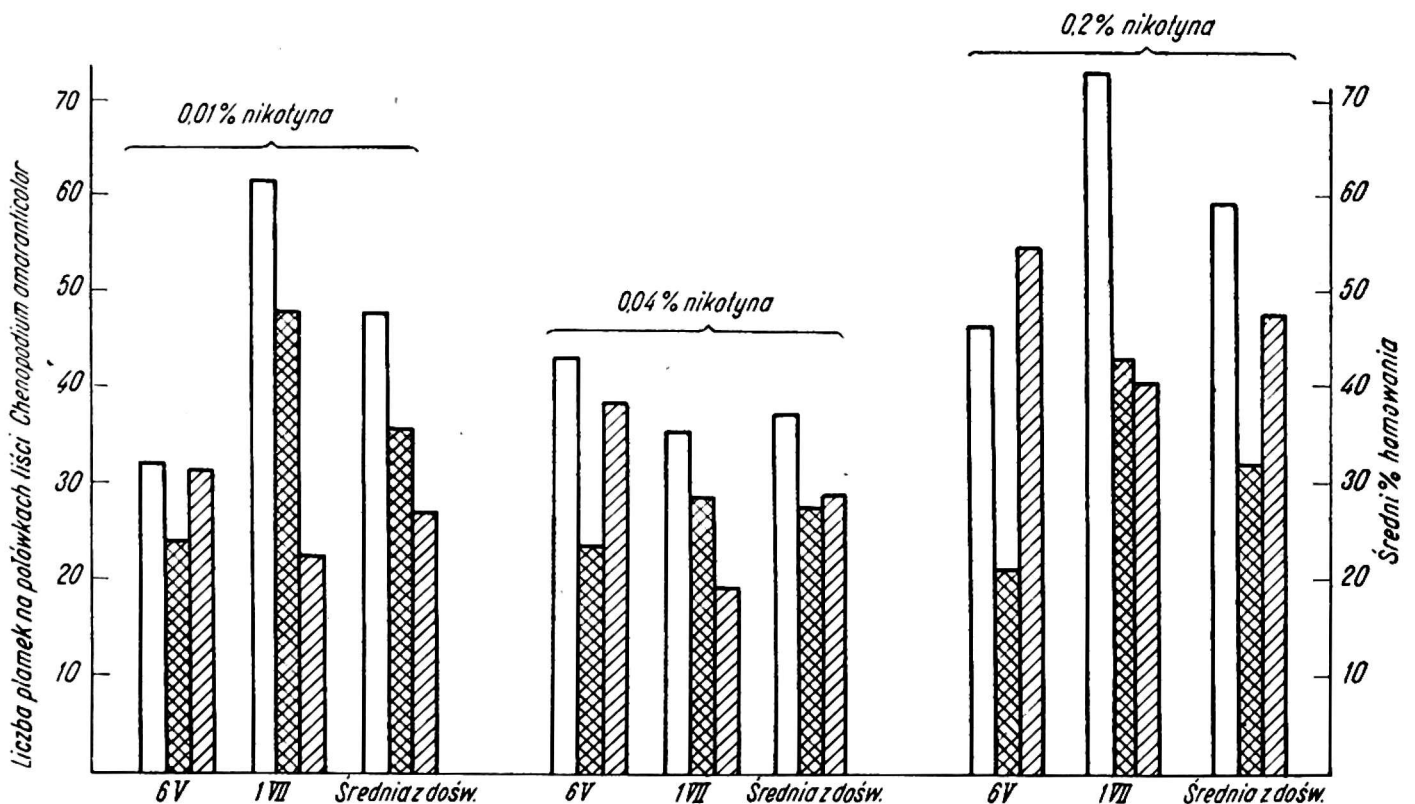
Rysunek 9 przedstawia wyniki 9 doświadczeń wykonanych w 1967 roku. Średnia liczba plamek była testowana na połówkach liści tytoniu odmiany White Burley, koncentracja zastosowanej nikotyny wynosiła 0,04<sup>0</sup>%. Średnia liczba plamek na liściach testowych była mniejsza niż w kontroli, jednakże istnieje duża rozbieżność co do średniego procentu hamowania: zwłaszcza w doświadczeniach wykonanych przy końcu marca i z kwietnia 1967 r. średni procent hamowania był niski, co wpłynęło na średnią generalną hamowania (41,6<sup>0</sup>%) pomimo, iż w poszczególnych doświadczeniach stwierdzono dwukrotnie hamowania ponad 60<sup>0</sup>%, a nawet 70<sup>0</sup>%. Te wahania mogły być spowodowane niejednakową temperaturą panującą



Rys. 9. Wpływ nikotyny (0,04%) na namnażanie się wirusa X (*in vivo*) w tytoniu odmiany White Burley

1 — średnia liczba plamek w kontroli bez nikotyny, 2 — średnia liczba plamek w teście z nikotyną, 3 — średni procent hamowania

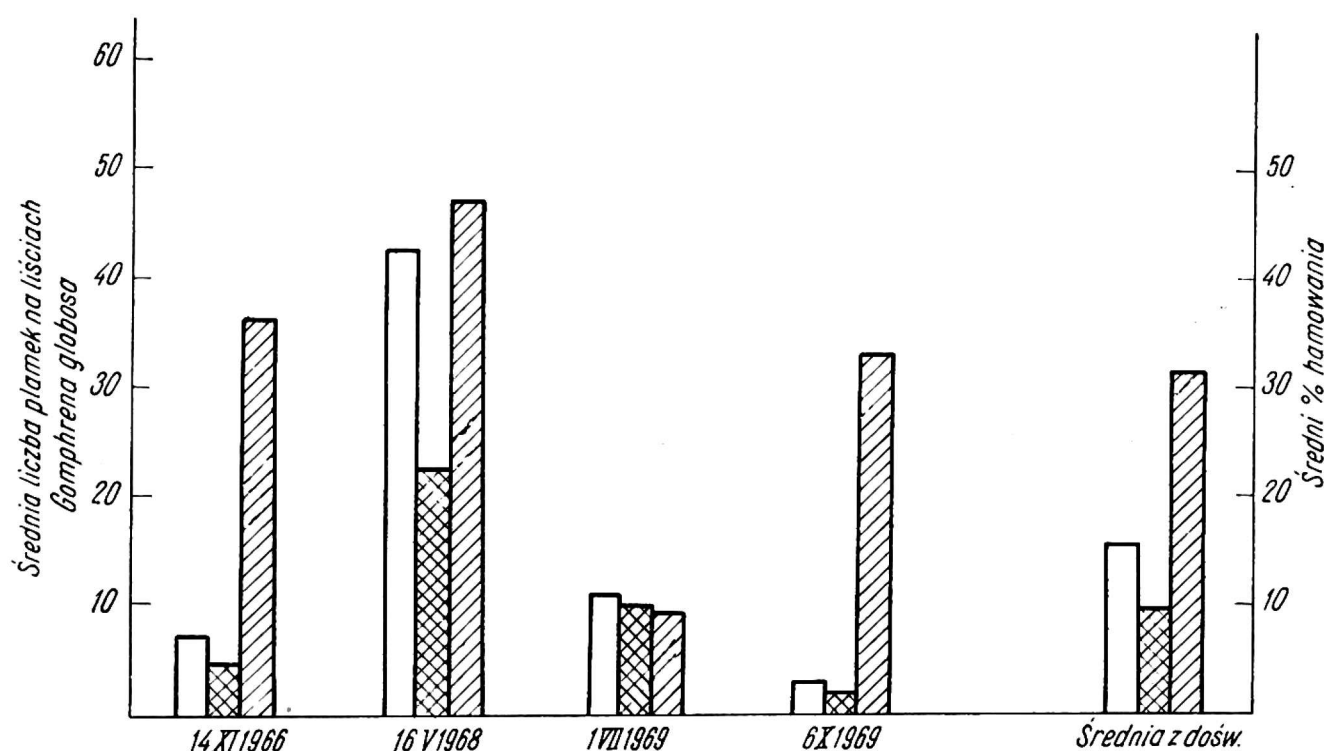
w szklarni. Niemniej jednak, jeśli porównamy rysunek 8 z rysunkiem 1, który przedstawia wyniki wpływu efedryny na wirus X, w tym samym czasie wykonane doświadczenie z 17 IV dały wysoki średni procent hamowania namnażania się wirusa X pod wpływem efedryny (około 50%), podczas gdy działanie nikotyny było niewielkie i średnia hamowania nie przekraczała 30%. To zjawisko jest trudne do wytłumaczenia.



Rys. 10. Wpływ nikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Chenopodium amaranticolor*. Objasnienia jak na rysunku 9



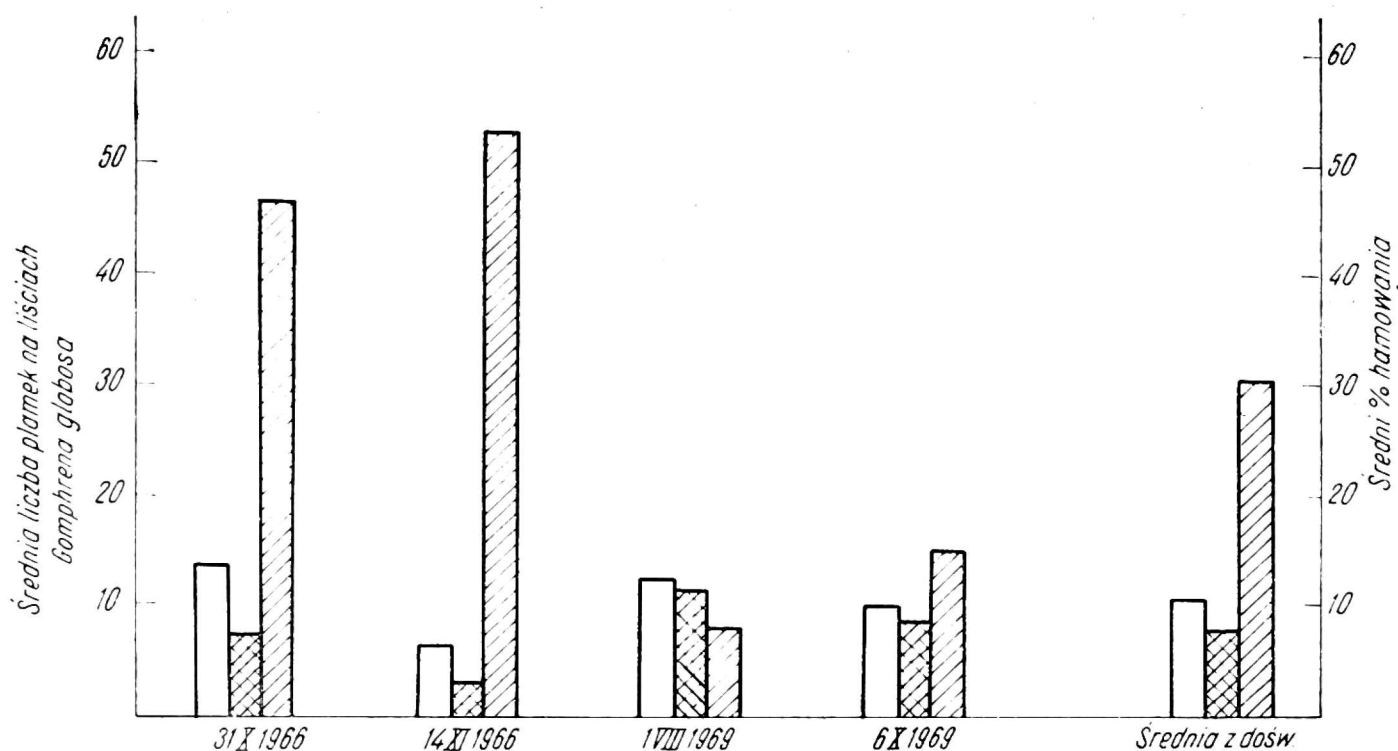
Rysunek 10 przedstawia 3 cykle doświadczeń również z nikotyną o 3 różnych koncentracjach alkaloidu. Pierwszy cykl — to wyniki otrzymane przy zastosowaniu 0,01% nikotyny, następny — 0,04%, a ostatni — 0,2% koncentracji alkaloidu. Plamki otrzymane po inokulacji wirusem X z dodatkiem alkaloidu (roztworem testowym) i bez dodatku alkaloidu (roztworem kontrolnym) badano na połówkach liści *Chenopodium amaranticolor*. W doświadczeniach tych zaznaczyła się wyraźnie zależność między koncentracją alkaloidu a natężeniem jego hamowania. Przy koncentracji 0,01% nikotyny średni procent hamowania wyniósł 26,8, przy stężeniu 0,04% — 28,7, a przy 0,2 — 47,6.



Rys. 11. Wpływ nikotyny (0,01%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Gomphrena globosa*. Objasnienia jak na rysunku 9

Rysunek 11 obrazuje wyniki działania nikotyny na wirus X. Stężenie nikotyny zastosowanej w tym doświadczeniu wynosiło 0,01%; plamki testowano na liściach II piętra *Gomphrena globosa*. Średni procent hamowania w tym doświadczeniu był niski (31,3). Wyjątkowo niskie hamowanie i słabe porażenie stwierdzono w doświadczeniu wykonanym 1 lipca, co jest możliwe, gdyż średnia temperatura dobowa w szklarni w tej porze roku sięga 30°C, a wiadomo z literatury, że namnażanie się wirusa X najlepiej przebiega w zakresie temperatur od 19°C do 25°C.

Rysunek 12 przedstawia wyniki podobnego doświadczenia jak rysunek 11, z tą różnicą, że stężenie nikotyny wynosiło 0,04%. Średnia generalna hamowania była prawie tego samego rzędu co na rysunku 11, pomimo wyższej koncentracji alkaloidu, i wynosiła 30,4%. Na niską średnią generalną wpłynęły wyniki doświadczeń z 1 VIII 1969 r. i z 6 X. Oba te doświadczenia były jednakże przeprowadzone w terminie niezbyt korzystnym, raz z powodu wysokiej średniej temperatury dobowej pa-



Rys. 12. Wpływ nikotyny (0,04%) na namnażanie się wirusa X ziemniaka (*in vivo*) w *Gomphrena globosa*. Objasnienia jak na rysunku 9

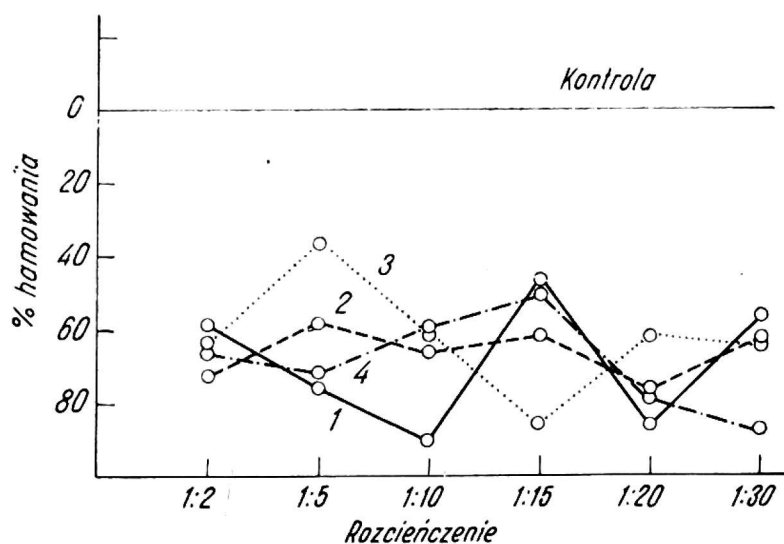
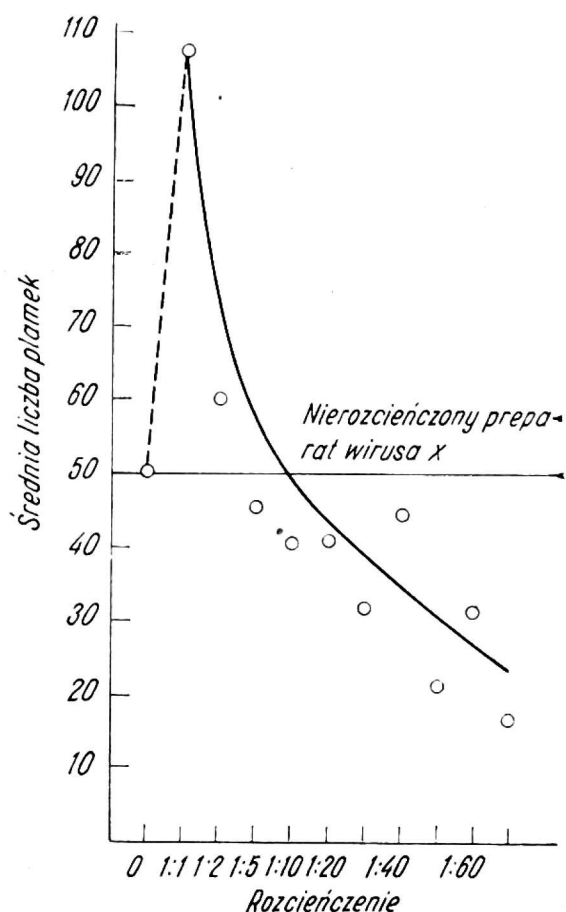
nującej w szklarni (dotyczy doświadczenia z 1 VIII), a po drugie, jak już wspomniano, w okresie jesiennym na ogół procesy metaboliczne u roślin przebiegają wolniej, co pociąga za sobą słabsze porażenie wirusem.

Analizując wyniki wszystkich doświadczeń nad wpływem nikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka można zauważyć w większości wypadków zależność między natężeniem hamowania a koncentracją alkaloidu. Dokładniejsze dane dotyczące obliczeń statystycznych opublikowano w pracy z 1972 r. [28].

Działanie nikotyny na wirusa X ziemniaka (*in vitro*). W dalszym etapie doświadczeń przebadano działanie alkaloidu nikotyny na oczyszczony preparat wirusa X (*in vitro*). Rysunek 13 przedstawia krzywą zależność między rozcieńczeniem wirusa a jego infekcyjnością wyrażoną jako liczba plamek otrzymanych po zakażeniu liści roślin *Gomphrena globosa*. Liczbę 50 plamek otrzymano dla preparatu wirusa X nierozcieńczonego, co zaznaczono na wykresie linią poziomą. Rozcieńczenia wirusa X wodą destylowaną w stosunku 1:1 oraz 1:2 dały infekcję większą aniżeli nierozcieńczony wirus X, natomiast od rozcieńczenia 1:5 zauważono stopniowy zanik infekcyjności wirusa X przebiegający proporcjonalnie do coraz większych rozcieńczeń preparatu wirusowego.

Rysunek 14 obrazuje działanie nikotyny (0,05%) na wirusa X ziemniaka *in vitro*. Przedstawia on krzywe otrzymane dla preparatu wirusa X, który był inkubowany w komorach świetlnych (natężenie światła około 2000 lx, temperatura około 20°C) przez 96 godzin. Procent hamowania obliczono na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i teście

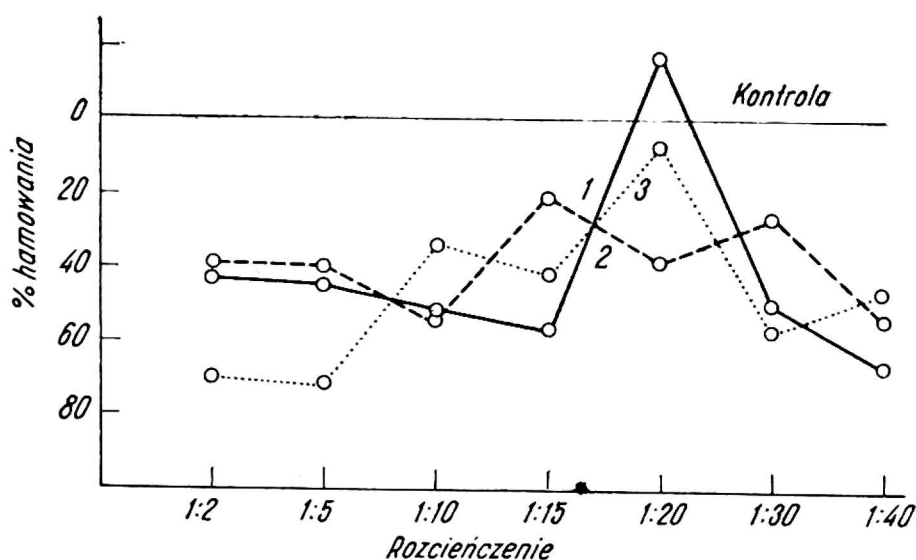
Rys. 13. Zależność między rozcieńczeniem wirusa a jego infekcyjnością w *Gomphrena globosa*



Rys. 14. Działanie nitkotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nikotyny inkubowany na świetle 2000 luks przez 96 godz. w temp. 20°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek na liściach poszczególnych 4-ch pięter *Gomphrena globosa*

1 — I piętro, 2 — II, 3 — III, 4 — IV

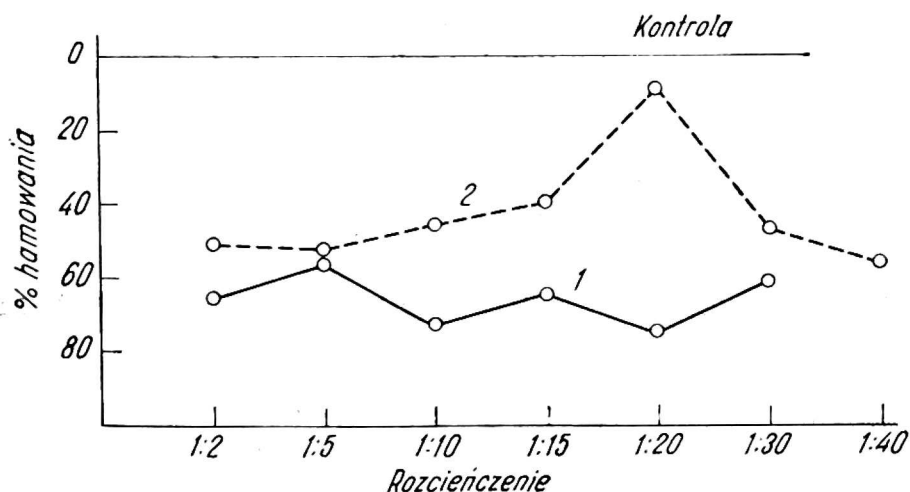
otrzymanych na liściach poszczególnych pięter rośliny *Gomphrena globosa* wg wzoru Uteha i Johnsona [69]. Poszczególne krzywe obrazują % hamowania otrzymane przy różnych rozcieńczeniach wirusa X na piętrze I, II, III i IV. Jak widać z tych krzywych procent hamowania tylko w jednym wypadku wynosił poniżej 40% przy rozcieńczeniu 1:5 dla krzywej III piętra. W większości przypadków hamowanie wynosiło około 70%, a w kilku nawet przekroczyło 80%.



Rys. 15. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nikotyny inkubowany w ciemności przez 96 godz. w temp. 4°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście na liściach 3-ch pięter *Gomphrena globosa*

1 — I piętro, 2 — II, 3 — III

Rysunek 15 obrazuje wyniki podobnego doświadczenia jak rysunek 14 z tą jednak różnicą, że wirus X był inkubowany w lodówce (w ciemności) w temperaturze około 4°C przez ten sam okres, tj. 96 godzin. Plamki liczono na liściach trzech pięter *Gomphrena globosa*. Z krzywych wynika, że w wypadku inkubacji wirusa X z dodatkiem nikotyny w niższej temperaturze i w ciemności hamowanie było słabsze przeciętnie około 40%, a w kilku przypadkach jeszcze mniejsze. Przy rozcieńczeniu wirusa X w stosunku 1:20 (I piętro) wystąpiła nawet stymulacja własności infekcyjnych wirusa X pod wpływem nikotyny. Tę stymulację zauważono jednak tylko w tym jednym przypadku.

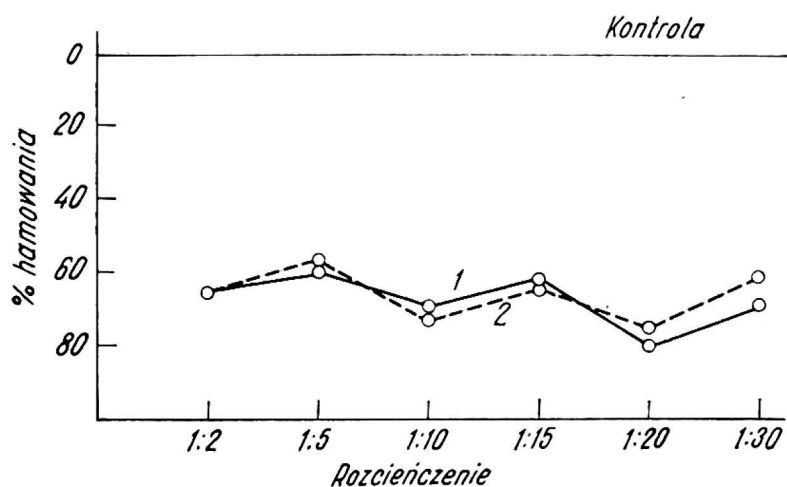


Rys. 16. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nikotyny, inkubowany przez 96 godz. na świetle 2000 luks w temp. 20° i w ciemności w temp. 4°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście z 3-ch pięter *Gomphrena globosa*

1 — na świetle, 2 — w ciemności

Rysunek 16 przedstawia hamowanie infekcji wirusowej pod wpływem 0,05% nikotyny. Zostało ono obliczone na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i teście otrzymanych po zakażeniu kilkunastu roślin *Gomphrena globosa* (20 roślin *Gomphrena globosa*) — inokulowano liście trzech pięter, czyli łącznie zakażono 30 liści. Liczba dla testu i kontroli była taka sama.

Jak widać z rysunku silniejsze hamowanie infekcji wirusa X pod wpływem nikotyny wystąpiło w wypadku inkubacji wirusa X na świetle i w wyższej temperaturze.



Rys. 17. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nikotyny inkubowanej przez 96 godz. na świetle 2000 luks w temp. 20°). Procent hamowania obliczono na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście na liściach *Gomphrena globosa*

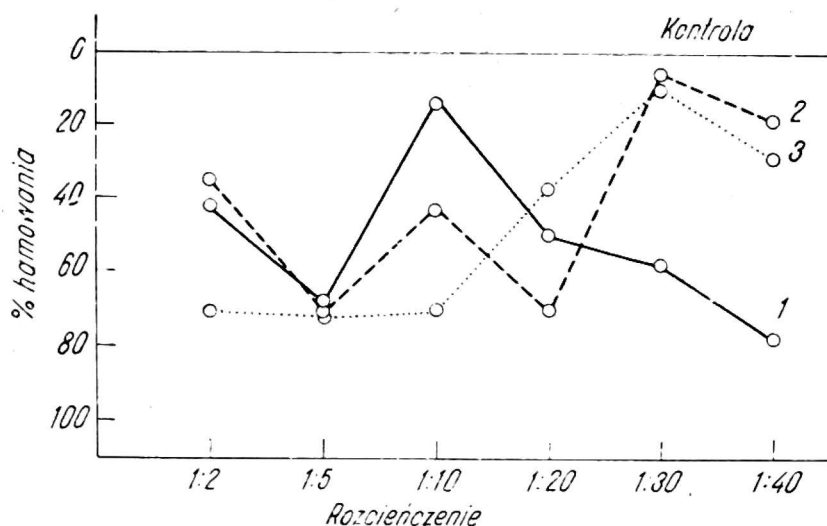
1 — średnia z 4-ch pięter, 2 — średnia z 3-ch pięter

Rysunek 17 pokazuje, że procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek otrzymanych po inokulacji liści trzech pięter, względnie czterech pięter roślin *Gomphrena globosa* jest zbliżony. A zatem nie jest istotne czy zakażenia dokonano na trzech piętrach roślin testowych, czy też czterech, ważne jest natomiast, aby inokulowano możliwie jak największą liczbę roślin, niwelując wówczas poszczególne indywidualności u osobników roślinnych. Wiadomo bowiem, że pozornie ten sam tytoń, czy inna roślina inokulowana tym samym preparatem wirusa, reaguje zazwyczaj indywidualnie — osobniczo.

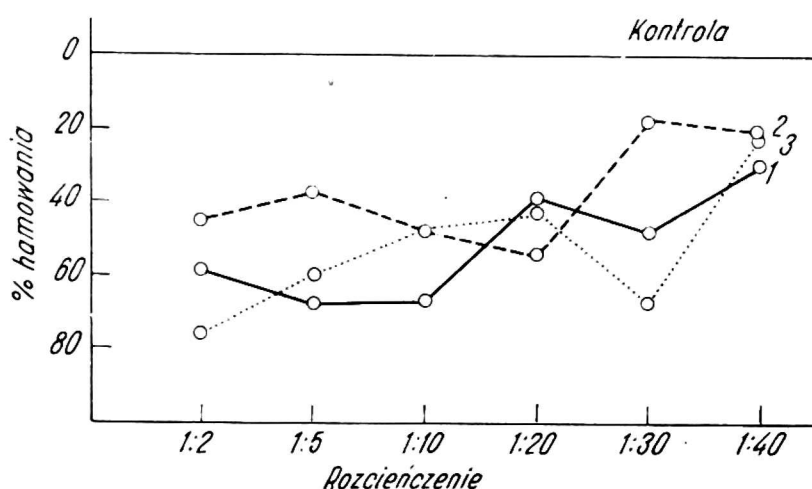
Działanie nornikotyny na wirusa X ziemniaka (*in vitro*). Przebadano również działanie alkaloidu nornikotyny na wirus X w ciemności w 2-ch koncentracjach alkaloidu: 0,1 oraz 0,05% względem preparatu wirusa X. Średnią liczbę plamek odczytano jak w poprzednich doświadczeniach na roślinach *Gomphrena globosa*.

Rysunek 18 obrazuje wyniki otrzymane po inkubacji wirusa X z 0,05% nornikotyną przez okres 96 godzin w ciemności w temperaturze około 4°C.

Rysunek 19 przedstawia podobne zależności, co rysunek 18, z tą różnicą, że zastosowano wyższą koncentrację nornikotyny — 0,1%. Hamo-



Rys. 18. Działanie nornikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nornikotyny inkubowanej przez 96 godz. w ciemności w temp. 4°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście na liściach 3-ch pięter *Gomphrena globosa*  
1 — I piętro, 2 — II, 3 — III

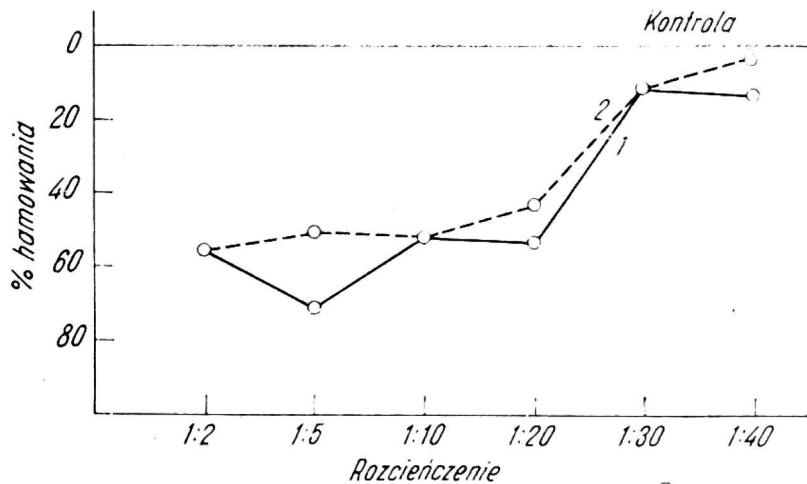


Rys. 19. Działanie nornikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,1% nornikotyny inkubowany przez 96 godz. w ciemności w temp. 4°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście na liściach 3-ch pięter *Gomphrena globosa*. Objasnienia jak na rysunku 18

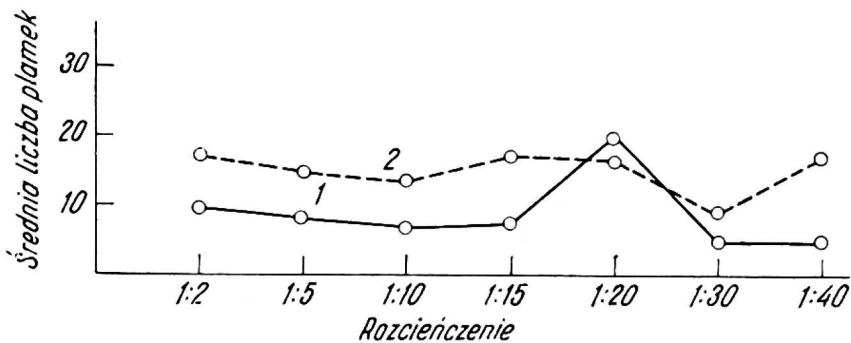
wanie infekcji wirusem X pod wpływem nornikotyny jest wyraźne i wynosi około 50-60%.

Rysunek 20 przedstawia zależność między hamowaniem infekcji wirusem X a koncentracją zastosowanej nornikotyny. Jak widać z wykresu, nie ma większych zależności między koncentracją zastosowanego alkaloidu nornikotyny a % hamowania. Obydwie krzywe pokazują, że w miarę rozcieńczania preparatu użytego do zakażeń roślin testowych procent hamowania zmniejsza się wraz z malejącą liczbą plamek sygnalizujących intensywność porażenia.

Reakcję liści *Gomphrena globosa* na zakażenie wirusem X w zależności od pięter obrazują rysunki 21-24. Z wykresu 21 można zauważyć



Rys. 20. Działanie nornikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% — 1 i 0,1% — 2 nornikotyny inkubowanej przez 96 godz. w ciemności w temp. 4°). Procent hamowania obliczony na podstawie średniej liczby plamek w kontroli i w teście z 3-ch pięter *Gomphrena globosa*



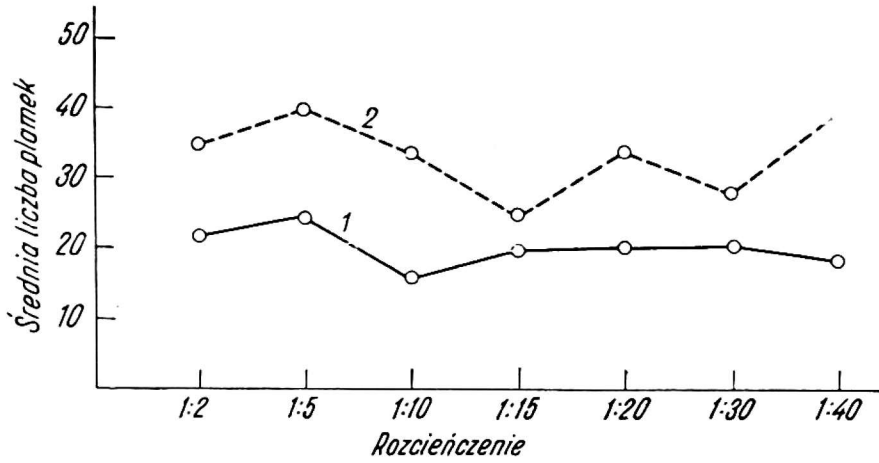
Rys. 21. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X ziemniaka z dodatkiem 0,05% nikotyny inkubowany przez 96 godz. w temp. 4° w ciemności). Średnia liczba plamek na I piętrze *Gomphrena globosa*  
1 — test, 2 — kontrola

hamujący wpływ nikotyny z wyjątkiem rozcieńczenia 1:20. Liczba plamek obserwowana na liściach I piętra roślin *Gomphrena globosa* nie przekroczyła liczby 20 plamek dla krzywej kontroli, a dla testowej — poniżej 10 (z wyjątkiem rozcieńczenia 1:20).

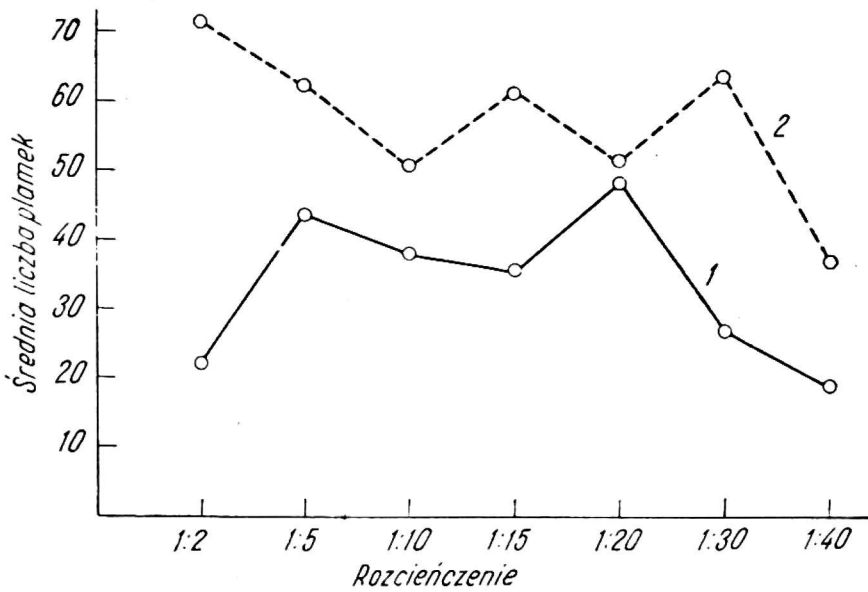
Rysunek 22 przedstawia również dwie krzywe dla takiego samego doświadczenia jak na rysunku 21 z tą różnicą, że plamki liczone na liściach II piętra roślin *Gomphrena globosa*. Liczba plamek wyniosła 40 dla krzywej kontroli, a dla testowej około 20.

Rysunek 23 przedstawia 2 krzywe dla tego samego doświadczenia z tą różnicą, że plamki liczone w tym wypadku na liściach III piętra roślin *Gomphrena globosa*. Liczba plamek dla krzywej kontroli dochodziła do 70, a dla krzywej testowej do 50.

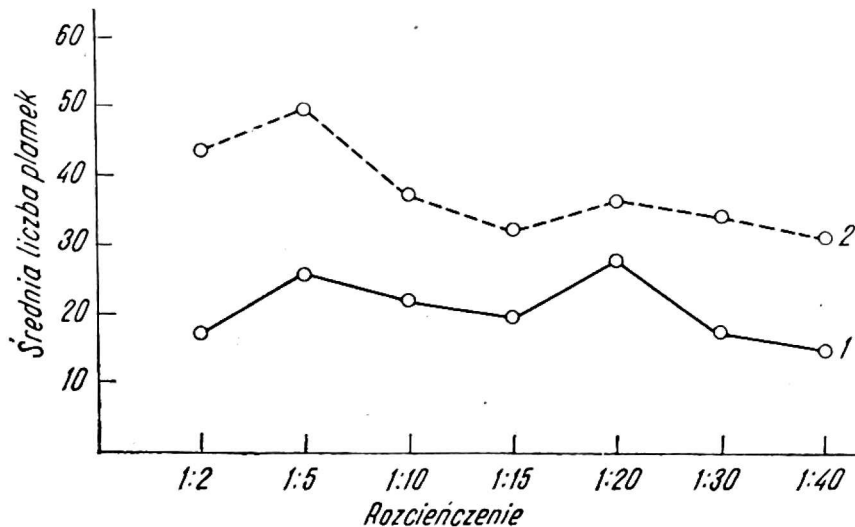
Rysunek 24 przedstawia 2 krzywe — kontrolną i testową, otrzymane na podstawie obliczenia średniej z trzech pięter. Wykres ten obrazuje wyraźnie działanie nikotyny na wirus X. Krzywa testowa przebiega poniżej



Rys. 22. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X z dodatkiem 0,05% nikotyny inkubowany przez 96 godz. w temp. 4° ciemności). Średnia liczba plamek na 2-im piętrze *Gomphrena globosa*  
1 — test, 2 — kontrola



Rys. 23. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro* (roztwór wirusa X z dodatkiem 0,05% roztworu nikotyny inkubowany przez 96 godz. w temp. 4° w ciemności). Średnia liczba plamek na 3-im piętrze *Gomphrena globosa*  
1 — test, 2 — kontrola



Rys. 24. Działanie nikotyny na wirus X ziemniaka *in vitro*. Średnia liczba plamek łącznie z 3-ch pięter *Gomphrena globosa*  
1 — test, 2 — kontrola

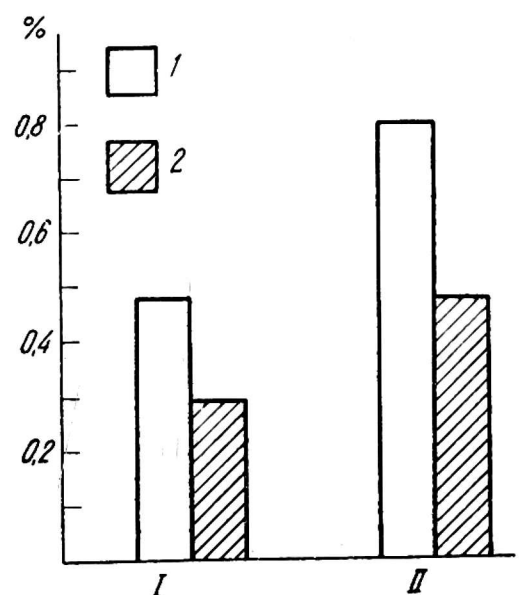


krzywej kontrolnej, co wskazuje na mniejszą liczbę plamek otrzymanych na liściach po inokulacji preparatem wirusa X poddanym działaniu nikotyny, aniżeli bez alkaloidu.

#### OZNACZENIE ZAWARTOŚCI NIKOTYNY W LIŚCIACH DWU ODMIAN TYTONIU

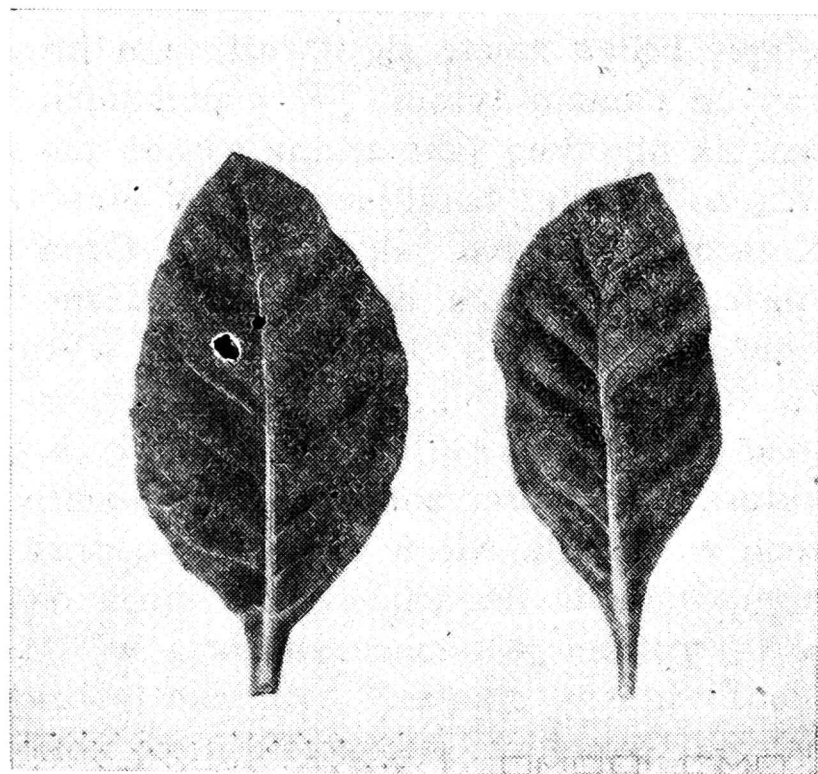
W dalszym etapie badań zajęto się określeniem zawartości nikotyny w liściach wybranych odmian tytoniu. W poprzednich doświadczeniach podawano z zewnątrz nikotynę jako wolną zasadę nie związaną w postaci soli. Stwierdzono również hamujący wpływ nikotyny na namnażanie się wirusa X zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Oznaczanie zawartości nikotyny miały na celu wykazanie, czy istnieje zależność między podatnością na zakażenie wirusem X a ilością nikotyny występującą w danej odmianie tytoniu. Oznaczenia nikotyny były przeprowadzone metodą spektrofotometryczną wg Kühna [40]. W badaniach tych chodziło o określenie nikotyny, która jest syntetyzowana w korzeniach [18, 49], a następnie gromadzona w liściach. Nie u wszystkich jednak odmian tytoniu nikotyna jest gromadzona w liściach, czasem ulega ona rozkładowi do nornikotyny i w tej postaci jest magazynowana w liściach [9, 10]. Do oznaczeń wybrano 2 odmiany nikotyny *Nicotiana tabacum* — Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux, odznaczające się mniejszą podatnością na zakażenia wirusem X w stosunku do innych odmian, np. White Burley.

Ambalema Gembloux pochodzi z Holandii (1951 rok), odkryta wcześniej w Kolumbii przez Nolla [52] w 1929 roku — charakteryzuje się pewną odpornością na wirusa mozaiki tytoniu, mniejszą jednak aniżeli Ambalema Bergerac. Ta ostatnia odmiana tytoniu odkryta również w Kolumbii przez Nolla i Roque [53] w 1933 roku, została dokładnie przebadana przez Nolla w latach 1935 i 1939; odporność jej na wirusy jest uwarunkowana genetycznie. W wypadku zakażenia wirusem X (liści ty-

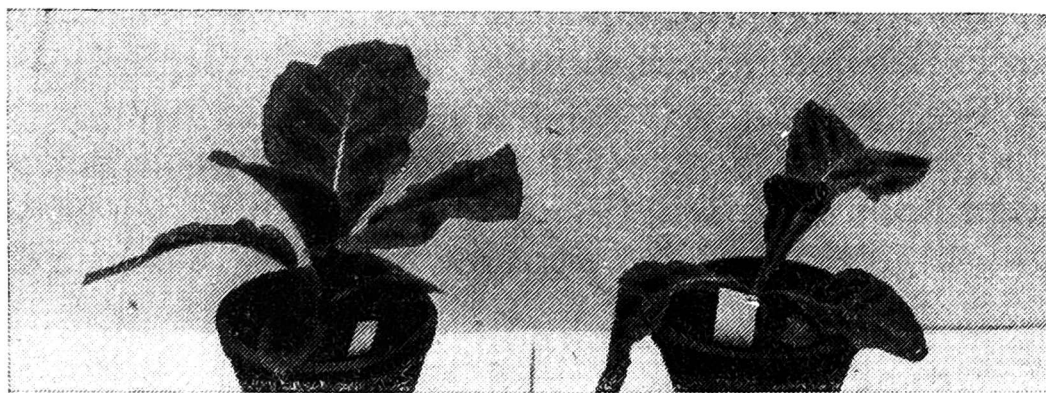


Rys. 25. Zawartość nikotyny w przeliczeniu na 1 g suchej masy 1 — Ambalema Bergerac, 2 — Ambalema Gembloux, I — stadium 6-7 liści, II — stadium 11-12 liści

toniu odm. Ambalema Gembloux) na liściach jej występują dobrze widoczne zmiany chlorotyczne- dużo wyraźniejsze, niż na liściach tytoniu Ambalema Bergerac (rys. 26, 27).



Rys. 26. Liście tytoniu Ambalema Gembloux (z lewej) i Ambalema Bergerac porażone wirusem X ziemniaka (fot. S. Grzesiak)



Rys. 27. Rośliny tytoniu Ambalema Gembloux (z lewej) i Ambalema Bergerac porażone wirusem X ziemniaka (fot. S. Grzesiak)

Liście tytoniu Ambalema Gembloux odznaczają się mniejszą zawartością nikotyny i większą podatnością na zakażenie wirusem X w stosunku do tytoniu Ambalema Bergerac (rys. 25). Jak widać z rysunku procent nikotyny jest nie tylko zależny od stadium rozwojowego rośliny, ale również od odmiany [56, 36]. Wiadomo również z literatury [30, 45, 46], że ilość nikotyny zmienia się w zależności od wielu czynników, jak nasłonecznienie, wilgotność, nawożenie itp.

Liście tytoniu, które były badane w tej pracy, pochodziły z hodowli szklarniowych. Rośliny rosły w doniczkach w ziemi sterylizowanej, ale nawet w wypadku hodowli szklarniowej stwierdzono, że te same od-

miany pochodzące z dwóch szklarni (jedna seria roślin pochodziła z bok-sów szklarniowych nieklimatyzowanych z fitotronu w Chełmie, a druga seria — z wolno stojącej szklarni Akademii Rolniczej) miały różną zawartość nikotyny. Liście odmian Ambalema Gembloux i Ambalema Bergerac zebrane w boksach szklarniowych w fitotronie w lutym 1974 r., przy bardzo małej wilgotności (poniżej 40%) i temperaturze (powyżej 30°C) nie wykazały różnic co do zawartości nikotyny pomiędzy tymi dwiema odmianami tytoniu (ilość nikotyny uległa podwyższeniu u Ambalema Gembloux). Natomiast rośliny tytoniu Ambalema Bergerac hodowane w szklarni Akademii Rolniczej przy wyższej wilgotności (około 60%) i niższej temperaturze (ok. 25°C) wykazywały zawsze większą zawartość nikotyny w stosunku do Ambalema Gembloux (tab. 1).

Tabela 1

Procentowa zawartość nikotyny w liściach tytoniu (w przeliczeniu na 1 g suchej masy)

Seria	Termin zbioru materiału roślinnego	Ambalema Gembloux	Ambalema Bergerac	Stadium roślin (liczba liści)
I	7 III 1972	0,303	0,490	6-7
II	2 XII 1972	0,320	0,517	7-8
III	27 XII 1972	0,358	0,560	7-8
IV	21 III 1973	0,396	0,681	8-10
V	23 II 1974	0,568	1,003	12-13
VI	23 II 1974	0,701	0,692	8-10
VII	20 IV 1974	0,516	0,502	6-7

Seria I, II, IV, V — rośliny hodowane w szklarni AR w Krakowie.

Seria III — rośliny hodowane w wolno stojącej szklarni Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego w Czynnach.

Seria VI, VII — rośliny hodowane w fitotronie w Chełmie (w komorach nieklimatyzowanych).

Zawartość nikotyny oznaczano również w liściach kilku innych odmian tytoniu (hodowla w szklarni) przez okres 5 dni od momentu zakażenia wirusem X, tj. w okresie, kiedy badano wpływ nikotyny na zakażenie wirusem X (*in vivo*). Tabela 2 przedstawia wyniki tego doświad-

Tabela 2

Zawartość nikotyny w liściach tytoniu zdrowych i zakażonych wirusem X

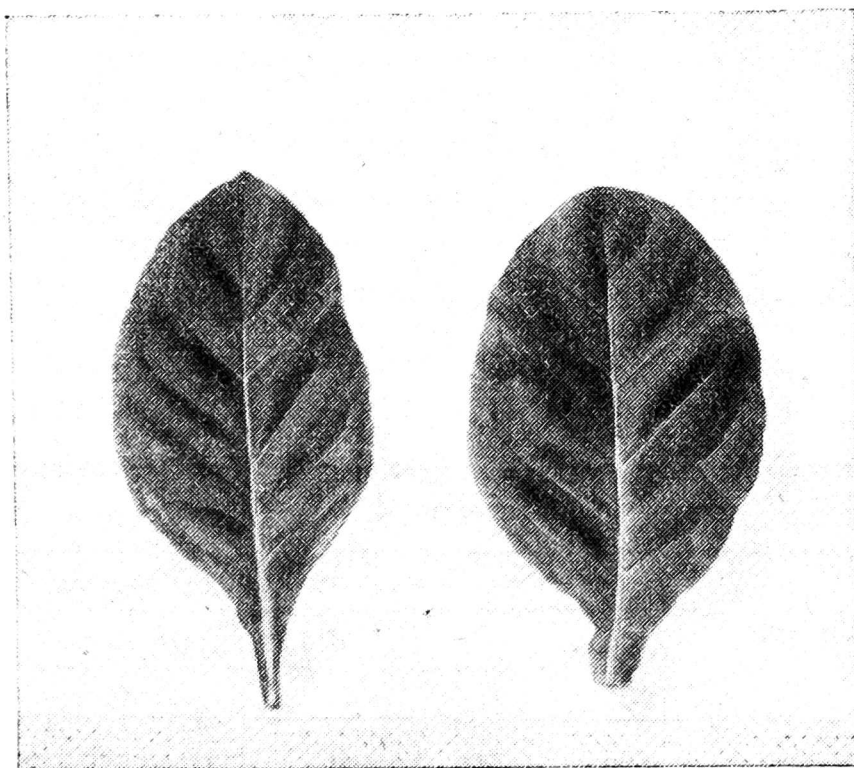
Odmiana	Procent nikotyny na 1 g suchej masy					
	rośliny zdrowe	dni po zakażeniu				
		1	2	3	4	5
White Burley	0,660	0,651	0,660	0,680	0,670	0,680
Samsun	0,528	0,544	0,511	0,462	0,495	0,561
Ambalema Gembloux	0,511	0,494	0,536	0,534	0,561	0,544

czenia. Jak widać z tabeli, w liściach tytoniu zakażonych wirusem X — odmiana White Burley, Ambalema Gembloux oraz Samsun nie ma więcej nikotyny niż w liściach kontrolnych (niezakażonych), co badano przez 5 dni od momentu inokulacji wirusem. Schuster [64, 65], Silberschmidt [66] podają, że zawartość alkaloidów, w tym głównie nikotyny zwiększa się po 7-10 dniach od momentu zakażenia wirusem.

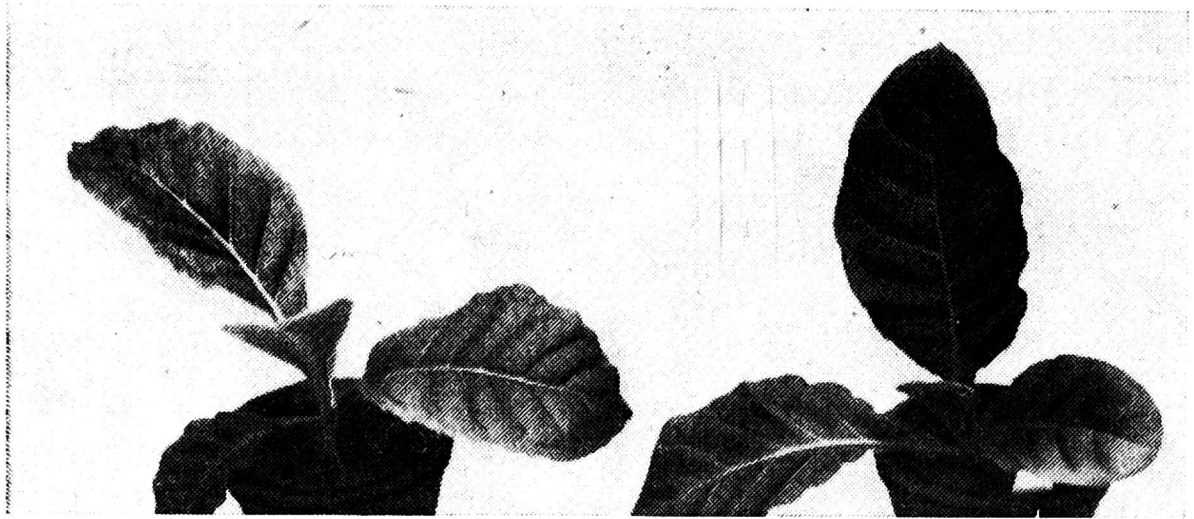
MIESZANIEC GENERATYWNY DWÓCH ODMIAN TYTONIU AMBALEMA BERGERAC  
I AMBALEMA GEMBOUX

Większa zawartość nikotyny u odmiany tytoniu Ambalema Bergerac w stosunku do Ambalema Gembloux oraz ich niejednakowa podatność na zakażenie wirusem X skłoniły do skrzyżowania tych odmian. Chodziło bowiem o stwierdzenie, czy w pokoleniu  $F_2$ , w którym pojawiają się rośliny wykazujące odporność na zakażenie wirusem X wystąpi również wzmożona synteza nikotyny. Wiadomo [48], że w pokoleniu  $F_2$  na 16 roślin zakażonych wirusem mozaiki tytoniu może wystąpić tylko jedna odporna na zakażenie wirusem X. U roślin pokolenia  $F_2$ , które będą wykazywać odporność na infekcję wirusem X, na podstawie oznaczenia zawartości nikotyny możnaby stwierdzić, czy istnieje zależność między odpornością a zawartością tego alkaloidu.

Krzyżowanie wspomnianych odmian tytoniu było dokonane jako tzw. krzyżowanie obukierunkowe względnie przeciwne. Przeprowadzenie tego rodzaju krzyżowania jest w zasadzie rzeczą prostą i nieskomplikowaną, jednakże w wypadku tej pracy największą trudnością było to, że kwitnienie tytoniu Ambalema Bergerac było zawsze opóźnione w stosunku



Rys. 28. Liście tytoniu pokolenia  $F_2$  z krzyżowania Ambalema Bergerac  $\times$  Ambalema Gembloux; z lewej roślina bardziej podatna na zakażenie wirusem X ziemniaka, z prawej — mniej podatna (fot. S. Grzesiak)



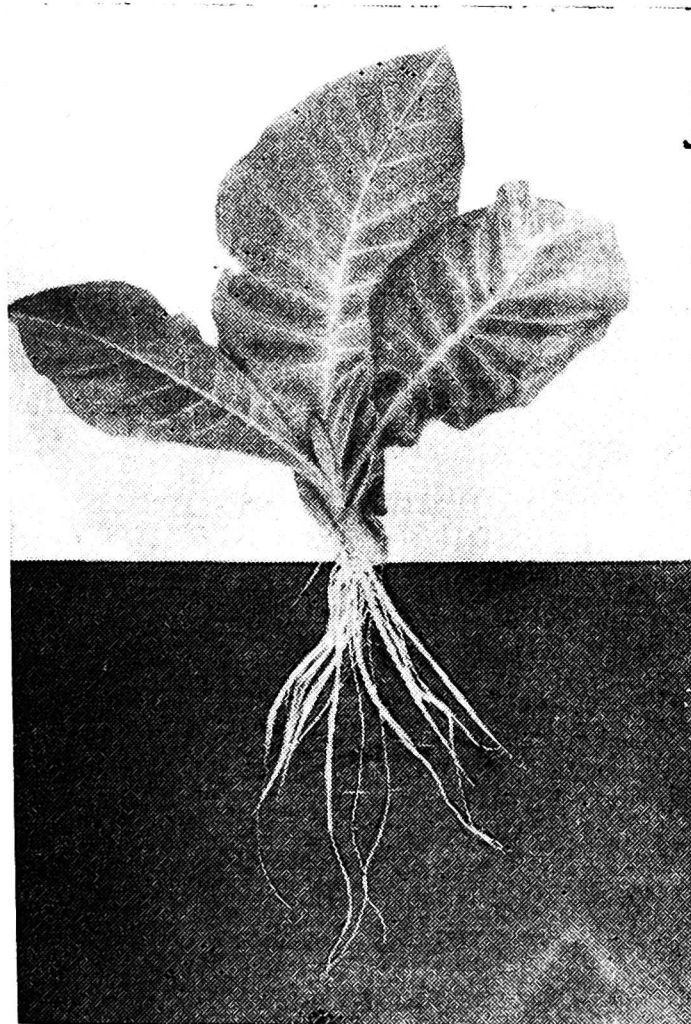
Rys. 29. Rośliny tytoniu pokolenia  $F_2$  z krzyżowania Ambalema Bergerac  $\times$  Ambalema Gembloux; z lewej roślina bardziej podatna na zakażenie wirusem X ziemniaka, z prawej — mniej podatna (fot. S. Grzesiak)

do kwitnienia tytoniu Ambalema Gembloux. Zmuszało to do długiego wyczekiwania na moment, kiedy obydwie odmiany można było skrzyżować. Rośliny pokolenia  $F_1$  pod względem morfologii były zbliżone do Ambalema Gembloux, natomiast w pokoleniu  $F_2$  niektóre osobniki przypominały liście tytoniu Ambalema Bergerac, ale w dalszym ciągu przeważały cechy tytoniu Ambalema Gembloux.

Po zakażeniu 160 roślin tytoniu pokolenia  $F_2$  wirusem X ziemniaka tylko kilka roślin nie wykazało objawów zawirusowania, względnie bardzo słabe (rys. 28, 29). Sprawdzone na zawartość wirusa X poszczególne liście tych kilku wybranych roślin tytoniu nie wykazujących objawów porażenia przez inokulację roślin testowych *Gomphrena globosa* sokiem wyciśniętym z badanych liści tytoniu. Ostatecznie na rozmnożenie wegetatywne przez ścięcie wierzchołka pozostawiono 6 roślin nie wykazujących objawów porażenia. Rośliny ze ściętym wierzchołkiem wypuszczały nowe pędy boczne (tuż u nasady liścia), które ścinano po upływie 10 do 14 dni i umieszczano w erlenmayerkach wypełnionych wodą i osłoniętych przed światłem czarnym papierem fotograficznym (rys. 30, 31). Następnie czekano znowu około dwóch tygodni, aż boczne pędy ukorzenia się i wyjmowano je z erlenmayerek przesadzając do doniczek z ziemią. W ten sposób z jednej rośliny otrzymać można było 3 nowe rośliny, a czasem i więcej. Jeśli chodzi o zdolność wypuszczania korzonków u ściętych bocznych pędów wynosiła ona 85,7%. Istnieją duże trudności metodyczne przy oznaczeniach zawartości nikotyny, należy bowiem zastosować taką mikrometodę, i to ilościową, która dałaby możliwość oznaczenia zawartości nikotyny w liściach jednej rośliny. Stosowana metoda spektrofotometryczna [40], jak również chromatografia gazowa wymagają kilku gramów suszu liściowego do oznaczenia nikotyny. Kilka gramów suszu liściowego można otrzymać z co najmniej kilku roślin, względnie kilkunastu, co naturalnie wiąże się z wiekiem — stadium rośliny oraz



Rys. 30. Rozmnożone wegetatywnie rośliny tytoniu nie podatne na wirus X ziemniaka w naczyniu z wodą wodociągową (fot. S. Grzesiak)



Rys. 31. Rozmnożone wegetatywnie rośliny tytoniu nie podatne na wirus X ziemniaka po wyjęciu z naczynia z wodą (fot. S. Grzesiak)

wielkością liści. Oznaczenia nikotyny w tytoniu należałoby dokonywać w stadium kilkunastu liści, jeszcze przed okresem kwitnienia rośliny.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano w pokoleniu tytoni  $F_2$  rozszczepienie co do odporności na wirusa X w stosunku 1 : 30, tj. znacznie mniejszym, niż podaje literatura dla wirusa mozaiki tytoniu.

OZNACZANIA BIOCHEMICZNE ZAWARTOŚCI WIRUSA X W ODMIANACH TYTONIU RODZICIELSKICH I ICH MIESZAŃCU

Przy pomocy metody biochemicznej Shimomura przeprowadzono próby oznaczeń zawartości RNA-PVX w liściach tytoniu Ambalema Gembloux, Ambalema Bergerac oraz pokoleniu  $F_1$  pochodzącym ze skrzyżowania tych dwu odmian.

Tabela 3

Zawartość RNA-PVX w liściach tytoniu w okresie jesiennym

Odmiana tytoniu	Objawy pierwotne	Objawy wtórne
Ambalema Bergerac	0,229	0,039
Ambalema Gembloux	0,469	0,347
$F_1$ — Ambalema Bergerac ♀	0,287	0,017
$F_1$ — Ambalema Gembloux ♀	0,338	0,289

Wyniki podane w tabeli 3 pochodzą z doświadczenia, w którym zbierano liście tytoniu porażone wirusem X w dwunastym dniu od momentu inokulacji i liście nieinokulowane (kontrola). Zawartość wirusowego kwasu rybonukleinowego oznaczano w liściach z objawami pierwotnymi i wtórnymi. Z liści tytoniu porażonych i zdrowych (8 roślin porażonych i 8 kontrolnych) wycinano krążki o średnicy 1 cm (przy pomocy korkoboru) z ośmiu liści z objawami pierwotnymi (piąte licząc od dołu) oraz z ośmiu z objawami wtórymi (siódme liście od dołu). Poszczególne próbki były średnią z tego samego liścia z 8 roślin, przez co stanowiły bardzo dobry materiał do powtórzeń. Tabela 3 podaje wyniki, z których widać, że ilość RNA-PVX wyrażona jako odczyt spektrofotometryczny przy  $E = 260 m\mu$  (wynik podany jako średnia różnica z 3 odczytów dla liści kontrolnych i porażonych wirusem X) jest znacznie większa zarówno w wypadku objawów pierwotnych, jak i kontrolnych dla Ambalema Gembloux (bardziej podatnej na wirusa X) aniżeli dla Ambalema Bergerac. Podobną zależność można zauważyć dla pokolenia  $F_1$  mieszańca w wypadku gdy Ambalema Bergerac była matką.

Następne serie doświadczeń prowadzone w marcu 1973 r. (poprzednio opisana seria była z listopada 1972) nie dały tak wyraźnych różnic co do ilości RNA-PVX (tab. 4) między poszczególnymi próbkami. Wartości ek-

T a b e l a 4

Zawartość RNA-PVX w liściach tytoniu w okresie wiosennym

Odmiana tytoniu	Objawy pierwotne		Objawy wtórne	
	doświad- czenie I	doświad- czenie II	doświad- czenie I	doświad- czenie II
Ambalema Bergerac	0,065	0,029	0,107	0,017
Ambalema Gembloux	0,101	0,036	0,166	0,044
F <sub>1</sub> — Ambalema Bergerac ♀	0,035	0,060	0,047	0,016
F <sub>1</sub> — Ambalema Gembloux ♀	0,076	0,060	0,088	0,043

stynkcji  $E_{260m\mu}$  są bardzo niskie i stąd trudność jakiegokolwiek interpretacji tych wyników. W obu seriach doświadczeń przeprowadzonych w marcu stwierdzono dużo mniejsze objawy porażenia wirusem X, co wykazały obserwacje symptomów inokulowanych roślin. Ogólnie można jednakże stwierdzić, że ilość RNA-PVX jest zawsze mniejsza w porażonych liściach tytoniu Ambalema Bergerac — odmiany mniej podatnej na infekcję wirusową i zawierającej więcej nikotyny, aniżeli Ambalema Gembloux.

DZIAŁANIE SOKÓW WYCIŚNIĘTYCH Z LIŚCI TYTONIU ODMIAN AMBALEMA  
GEMBOUX I AMBALEMA BERGERAC NA WIRUSA X *IN VITRO*

Ze względu na interesujące właściwości tytoniu odmiany Ambalema Bergerac, który — jak już podkreślano — charakteryzuje pewna odporność na zakażenie wirusem X, przeprowadzono badania przy pomocy testu biologicznego nad działaniem soków roślinnych wyciśniętych z liści tytoniu Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux na wirusa X *in vitro*.

Doświadczenie to przeprowadzono w następujący sposób: zbierano liście 4-e i 5-e (licząc od nasady rośliny) zarówno z tytoniu Ambalema Bergerac jak i Ambalema Gembloux. Następnie liście miażdżono w moździerzach, wyciskano z nich sok i odwirowywano w wirówce typu Sorvall przy 4000 obr/min. Do 1 ml próbek odwirowanego soku dodawano 1 ml preparatu wirusa X oczyszczonego metodą Corbetta. Kontrolę stanowiła próbka, w której znajdował się oczyszczony preparat wirusa X bez dodatku odwirowanego soku roślinnego. Po wymieszaniu zawartości próbek znajdujących się w próbkach za pomocą bagietek szklanych i uszczelnieniu sterylizowaną cynfolią wstawiano je do lodówki na okres 96 godzin (temperatura około 4°C). Po upływie tego czasu inokulowano liście rośliny testowej *Gomphrena globosa* wirusem X z dodatkiem soku wyciśniętego z liści tytoniu Ambalema Bergerac, względnie Ambalema Gembloux.

Średnią liczbę plamek (tab. 5A) obliczono na podstawie liczby plamek otrzymanych na zakażonych liściach *Gomphrena globosa*. Następna część



Tabela 5

Działanie soku z liści tytoniu Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux na wirus X ziemniaka (*in vitro*)

Wyszczególnienie	Liście							
	Ambalema Bergerac				Ambalema Gembloux			
	4		5		4		5	
	kon- trola	test	kon- trola	test	kon- trola	test	kon- trola	test
A								
Średnia liczba plamek z 3 pięter	81,6	7,1	36,6	1,3	31,0	42,0	35,7	23,0
	51,0	11,0	74,0	7,0	17,0	3,0	4,1	2,0
	36,0	3,0	80,0	7,0	24,0	14,0	14,0	4,6
	71,5	13,2	82,6	2,3	8,3	9,3	7,3	5,3
	38,3	6,0	101,0	5,3	24,6	9,0	15,0	2,6
	48,3	5,6	70,3	12,0	29,3	26,6	14,0	5,3
	49,0	4,6	47,6	8,6	73,0	29,6	30,6	4,6
	33,3	16,3	96,3	6,3	20,3	10,3	21,0	4,0
Liście <i>Gomphrena Globosa</i>								
B								
Średnia liczba plamek z 24 liści	55,8	8,4	73,6	6,2	28,7	17,9	17,7	6,4
C								
Procent hamowania	84,9		91,1		37,6		63,2	

tabeli (B) obrazuje średnią liczbę plamek obliczoną z 24 liści (na każdej z ośmiu roślin zakażono 3 liście —  $8 \times 3 = 24$ ), przy czym na każdym piętrze jeden liść inokulowano wirusem X, a przeciwległy wirusem X zmieszany z sokiem z liści wyżej wymienionych tytoni. Liczba plamek otrzymanych po inokulacji wirusem X zmieszany z sokiem z liści Ambalema Bergerac była znacznie mniejsza niż inokulowanych samym wirusem X. Sok z liści Ambalema Bergerac ma silniejsze właściwości hamujące namnażanie się wirusa X, co widać z tabeli (C), na podstawie obliczonego procentu hamowania. Można również zauważyć zależność, że sok wyciśnięty z liści 5-tych ma silniejszą zdolność hamowania aniżeli z 4-tych. To zjawisko zaznacza się wyraźniej u tytoniu Ambalema Gembloux niż u Ambalema Bergerac, u której zarówno sok z liści 4-tych jak i 5-tych wykazał bardzo wysokie zahamowanie namnażania się wirusa X, bo 84,9 i 91<sup>0</sup>/o.

WŁAŚCIWOŚCI SOKU Z LIŚCI KILKU ODMIAN TYTONIU O RÓŻNEJ ZAWARTOŚCI  
NIKOTYNY A REAKCJA NA PORAZENIE WIRUSEM X ZIEMNIAKA

Nawiązując do stwierdzonego w tej pracy działaniem hamującego alkaloidu nikotyny na namnażanie się wirusa X, przeprowadzono doświadczenie, które w pewnym stopniu mogłoby wyjaśnić, czy zawarty w danej

odmianie tytoniu alkaloid nikotyna ma wpływ na zdolności infekcyjne soku wyciśniętego z liści tych odmian.

Do doświadczeń użyto czterech odmian tytoniu *Nicotiana tabacum* o różnej zawartości nikotyny: Mocny Skroniowski, Virginia Peyod, Ambalema i Virginia Skroniowska, oraz gatunku *Nicotiana rustica*. Oznaczenia nikotyny były przeprowadzone u tych gatunków równocześnie z przeprowadzonym doświadczeniem. Po 15 roślin tytoniu inokulowano wirusem X ziemniaka, a do oznaczeń nikotyny pozostawiono po kilkanaście roślin zdrowych. Po upływie dwóch tygodni od inokulacji zbierano liście z roślin tytoniu, wyciskano z nich sok i inokulowano liście *Gomphrena globosa* (dla każdej odmiany 15 roślin *Gomphrena globosa*). Kontrolę stanowił sok z liści tytoniu Ambalema Gembloux, który charakteryzuje się w porównaniu z innymi badanymi odmianami niższą zawartością nikotyny. U każdej rodziny *Gomphrena globosa* inokulowano na każdym piętrze 1 liść sokiem wyciśniętym z liści Ambalema Gembloux, a przeciwległy — sokiem wyciśniętym z liści jednej z badanych odmian. Po upływie tygodnia od momentu inokulacji liści *Gomphrena globosa* liczono plamki na poszczególnych liściach.

Tabela 6

Reakcja na zakażenie wirusem X w zależności od zawartości nikotyny w liściach tytoniu

Odmiana tytoniu	Zawartość nikotyny w % na 1 g suchej masy	Średnia liczba plamek otrzymanych na liściach <i>Gomphrena Globosa</i> z 45 liści
<i>Nicotiana Rustica</i>	0,804	3,9
Ambalema Gembloux	0,469	15,3
Virginia Peyod	0,808	4,4
Ambalema Gembloux	0,469	19,8
Virginia Skroniowska	0,544	10,2
Ambalema Gembloux	0,469	19,9
Mocny Skroniowski	0,662	19,4
Ambalema Gembloux	0,469	19,6

Na tytoniu *Nicotiana rustica* i Virginia Peyod o wyższej zawartości nikotyny w stosunku do tytoniu Ambalema Gembloux — średnia liczba plamek (tab. 6) otrzymanych po inokulacji sokiem wyciśniętym z liści tych dwu odmian była bardzo mała w stosunku do średniej liczby plamek na Ambalema Gembloux.

W wypadku tytoniu Virginia Skroniowska zależność ta zarysowuje się słabiej, ponadto istnieje mała różnica co do zawartości nikotyny w stosunku do tytoniu Ambalema Gembloux. W wypadku tytoniu Mocny Skroniowski stwierdzono taką samą liczbę plamek (średnia 19,4), jak u tytoniu Ambalema Gembloux (średnia 19,6), chociaż te dwie odmiany różniły się zawartością nikotyny.

Przeprowadzone doświadczenie rzuca jednakże światło na istniejącą zależność między zawartością nikotyny w danej odmianie, a namnażaniem się w niej wirusa X ziemniaka.

#### DYSKUSJA WYNIKÓW

Z przeprowadzonych licznych doświadczeń nad działaniem nikotyny, efedryny i nornikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka wynika, że alkaloidy te wywierają hamujący wpływ na biosyntezę wirusa X. Można przypuszczać, że alkaloidy nie wpływają bezpośrednio na syntezę wirusów, ale wywierają pośredni wpływ na namnażanie się wirusa X ziemniaka. Stosowane alkaloidy nie wywierały niszczącego działania na krążki liściowe podczas trzymania ich na pożywkach z dodatkiem alkaloidów. Nikotyna zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wywarła hamujący wpływ na wirusa X ziemniaka. Stosowana metoda testów biologicznych okazała się dużo lepsza aniżeli oznaczenia biochemiczne przy określeniu zawartości wirusa X.

Liście *Gomphrena globosa* — rośliny testowej przy określaniu zawartości wirusa X — wykazały duże różnice pod względem reakcji na zakażenie wirusem w zależności od piętra.

Z prac Silberschmidta [66] i Schustera [64, 65] wynika, że ilość alkaloidów, w tym głównie nikotyny, zwiększa się około dziesiątego dnia po inokulacji roślin wirusem mozaiki tytoniu, względnie wirusem X ziemniaka. Z badań własnych wynika, że przez okres 5 dni od inokulacji wirusem X ilość nikotyny w liściach tytoniu nie uległa podwyższeniu w stosunku do liści nieinokulowanych. Schuster [63] podaje, że zwiększenie zawartości alkaloidów występowało również w zdrowych liściach tytoniu, co było związane z wrażliwością roślin na długość dnia. A mianowicie rośliny obojętne na długość dnia nie wykazywały żadnych wyraźnych różnic co do zawartości alkaloidów przy zmianie stosunku noc-dzień. Natomiast rośliny długiego dnia hodowane w warunkach skróconego dnia wykazywały wyraźny wzrost zawartości alkaloidów w porównaniu z takimi samymi kontrolnymi rosnącymi w warunkach długiego dnia. To samo zjawisko wystąpiło u roślin krótkiego dnia rosnących w warunkach długiego dnia. A zatem różna zawartość nikotyny może być fizjologiczną reakcją rośliny na długość dnia niezależnie od infekcji wirusowej.

Dalsze badania miały wyjaśnić hamujące działanie nikotyny na namnażanie się wirusa X ziemniaka. Odmiany tytoniu Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux odznaczają się słabszą reakcją na zakażenie wirusem X ziemniaka w stosunku do odmiany silnie wrażliwej — White Burley. Odmiany tytoniu Ambalema wykazują również niejednakową reakcję na porażenie wirusem X oraz zawierają różną ilość nikotyny. Ambalema Bergerac ma około 40% więcej nikotyny niż Ambalema Gembloux, ponadto reaguje dużo słabiej na porażenie wirusem X. W dalszym

etapie badań wydawało się słuszne przeprowadzenie krzyżowania genetywnego pomiędzy Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux doprowadzając do pokolenia  $F_2$ . Zamierzony cel określenia nikotyny w roślinach pokolenia  $F_2$ , które były niepodatne na infekcję wirusem X, okazał się dotychczas trudny do wykonania ze względu na brak odpowiedniej mikrometody oznaczania nikotyny w poszczególnych roślinach oraz zmianę warunków hodowli tytoniu (boksy szklarniowe nieklimatyzowane w Chełmie). Udało się natomiast uzyskać kilka roślin tytoniu w pokoleniu  $F_2$ , u których zauważono zmniejszoną podatność na zakażenie wirusem X; na 30 roślin pokolenia  $F_2$  jedna roślina nie była podatna na infekcję wirusową. Problem syntezy nikotyny w tytoniu z punktu widzenia genetyki nie jest jeszcze rozwiązany [31-35]. Oznaczenia biochemiczne ilości wirusa X wykazały wprawdzie pewne różnice zawartości tego wirusa u dwóch odmian tytoniu Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux, ale powtarzalność wyników nie była we wszystkich seriach doświadczeń zadowalająca.

W pracy prowadzono także próby oznaczenia ilości wirusa X w krążkach wyciętych z liści tytoniu poddanych działaniu nikotyny, ale żadna z metod biochemicznych nie była skuteczna, gdyż nikotyna daje maksimum pochłaniania światła w spektrofotometrze przy tej samej prawie długości fali, co cząsteczka wirusowa i dlatego alkaloid ten zawsze przeszkadzał przy tego rodzaju oznaczeniach. Wszelkie próby usunięcia nikotyny z ekstraktów roślinnych (krążków liściowych) przygotowywanych do badań w spektrofotometrze nie dały rezultatów. Trzeba podkreślić, że występująca normalnie i gromadzona w liściach tytoniu nikotyna, wytwarzana w roślinie nie przeszkadza przy oznaczeniach spektrofotometrycznych wirusa X (nikotyna występuje w roślinie w formie soli, a nie wolnej zasady).

Ciekawe właściwości biologiczne wykazują 2 odmiany tytoniu Ambalema. Ich różna reakcja na infekcję wirusową, różna zawartość całkowitego kwasu rybonukleinowego (25) oraz działanie hamujące soków wyciśniętych z ich liści na wirusa X *in vitro* jest zapewne godna podkreślenia.

Na podstawie wyników doświadczenia opisanego w tej pracy można stwierdzić, że soki wyciśnięte z liści tytoniu *Nicotiana rustica* i Virginia Peyod znacznie bardziej ograniczają liczbę plamek po inokulacji nimi liści *Gomphrena globosa* niż sok otrzymany z liści Ambalema Gembloux. Pierwsze dwa tytonie odznaczają się większą zawartością nikotyny w stosunku do tytoniu Ambalema Gembloux (tab. 6).

Nasuwa się myśl, że w sokach wyciśniętych z liści tytoniu oprócz nikotyny znajduje się wiele innych związków chemicznych, które mogą spowodować wyżej opisany efekt. Niemniej jednak, wszystkie badania przedstawione z tej pracy stanowią dowód na specyficzne działanie alkaloidu nikotyny na wirus X ziemniaka.

Ustalenie zależności między ilością nikotyny zgromadzoną w liściach tytoniu a jego podatnością na inokulację wirusem X wydaje się być zagadnieniem nie bezpośrednio łączącym się z efektem hamującym nikotyny na namnażanie się wirusa X, która jest podawana z zewnątrz roślinie w innej formie niż nikotyna syntetyzowana wprost w roślinie. Oczywiście jest przecież rzeczą, że ten sam związek chemiczny, który jest wytwarzany w danym organizmie, może wykazać zupełnie inne działanie, niż podawany z zewnątrz.

Grzebińska [22] w pracy z roku 1973 stwierdziła, że „Hipoteza dotycząca udziału alkaloidów w reakcjach odpornościowych roślin nie zyskała wielu zwolenników, jakkolwiek prace na ten temat sporadycznie pojawiają się do dzisiaj”.

Chociaż wielu autorów [54] podaje, że alkaloidy zalicza się do substancji zwanych „śmieciami metabolicznymi”, można jednakże na podstawie licznych doświadczeń przytoczonych w tej pracy sądzić, że alkaloidy spełniają w świecie roślinnym również ważną rolę, ale dotychczas jeszcze nie poznaną. Jak ważne zadanie spełniają alkaloidy w naukach farmaceutycznych i medycynie, tego nie trzeba podkreślać. Co do alkaloidu nikotyny wydaje się podnosić jej znaczenie i rangę w roślinie to, że jej najwyższa zawartość jest tam, gdzie najintensywniej przebiegają procesy życiowe.

#### WNIOSKI

1. W pracy wykazano wyraźny wpływ hamujący nikotyny, nornikotyny i efedryny na namnażanie się wirusa X ziemniaka. Alkaloidy te były badane zarówno jako inhibitory namnażania się wirusa, jak i inhibitory infekcji.

2. Istnieje pewne prawdopodobieństwo korelacji pomiędzy ilością nikotyny w roślinie tytoniu a jej reakcją na infekcję wirusem X ziemniaka.

3. Odmiany tytoniu *Nicotiana tabacum* L. — Ambalema Bergerac i Ambalema Gembloux są interesującymi odmianami ze względu na ich częściową odporność na infekcję wirusem X ziemniaka. Ponadto soki wyciśnięte z ich liści i zmieszane z oczyszczonym preparatem wirusa X ziemniaka powodowały zmniejszenie infekcyjności tego wirusa.

4. Przy podawaniu zawartości nikotyny dla jakiegokolwiek odmiany tytoniu należy ściśle uwzględnić i opisać warunki, w jakich dane rośliny były hodowane (uprawa polowa czy szklarniowa, wilgotność powietrza, skład gleby, temperatura, długość dnia i nocy).

5. Badając korelację między zawartością nikotyny a odpornością rośliny tytoniu na wirusa X należałoby przebadać kilka pokoleń i dobrać

odpowiednie mikrometody do oznaczania ilości nikotyny w liściach tytoniu.

6. Nikotyna okazała się silniejszym inhibitorem infekcji niż namnażania się wirusa.

7. *Gomphrena globosa* przedstawia bardzo dobry obiekt do testów biologicznych przy śledzeniu liczby plamek pojawiających się na jej liściach po inokulacji wirusem X ziemniaka.

8. Metody biochemiczne oznaczeń zawartości wirusa X w tkance roślinnej nie zawsze wykazywały zgodność z metodą testów biologicznych. Wydaje się, że w porównaniu z oznaczeniami metodą biochemiczną wirusa mozaiki tytoniu — w przypadku wirusa X ziemniaka lepsze są metody testów biologicznych.

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowanie Panu Prof. J. Kochmanowi za cenne uwagi przy redagowaniu tej pracy. Również dziękuję serdecznie Panu Dr. Z. Gajosowi kierownikowi Pracowni Hodowli Roślin w Centralnym Laboratorium Przemysłu Tytoniowego za umożliwienie prowadzenia doświadczeń i pomoc w wykonywaniu krzyżowania generatywnego. Pani Mgr inż. E. Dębowskiej dziękuję bardzo za oznaczenia biochemiczne i pomoc przy innych badaniach prowadzonych w tej pracy.*

#### LITERATURA

1. Ajzenman B. E., Zielepucha S. I. W., Drobotko W. G., Raszba E. A.: Antybiotyki. Kijew 1958, s. 5, 14, 22, 32, 168
2. Allen E. H.: The nature of antifungal substances in the peel of Irish Potato tubers. *Phytopath. Z.*, 1970, t. 69, s. 151-159
3. Allen E. H., Kuć J.:  $\alpha$ -Solanine and  $\alpha$ -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of Irish potato tubers. *Phytopath.*, 1968, t. 58, z. 6, s. 776-781
4. Arneson P. A., Durbin R. D.: Studies on the mode of action of tomatine as a fungitoxic agent. *Plant Physiol.*, 1968, t. 43, s. 683-686
5. Arneson P. A., Durbin R. D.: The sensivity of fungi to  $\alpha$ -tomatine. *Phytopath.*, 1968, t. 58, s. 536-537
6. Bancroft J. B., Curtis R. W.: A simple method using trichloacetic acid for estimating TMV concentration. *Phytopath.*, 1957, t. 47, s. 79-82
7. Bawden F. C.: Inhibitors and plant viruses. *Adv. Virus Res.*, 1954, t. 2, s. 31-57
8. Bawden F. C., Kleczkowski A.: Some properties of decomposition produces of potato virus X. *Virology*, 1959, t. 7, s. 375-384
9. Blaim K., Ciszewska R.: Badania mechanizmu powstawania nornikotyny z nikotyny. *Rocz. Chem.*, 1968, t. 42, s. 1025-1028
10. Blaim K., Ciszewska R.: Badania procesu demetylacji nikotyny w warunkach *in vivo*. *Acta agrobot.*, 1973, t. 26, z. 2, s. 303-309
11. Błaszczak W., Ross A. F., Larson R. H.: The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of potato virus X. *Phytopath.*, 1959, t. 49, z. 12, s. 784-791
12. Bobyr A. D.: The influence of alkaloids on the necrotic reaction caused by TMV. *Wop. Wirus.*, 1959, z. 4, s. 363-366
13. Creasey W. A.: Biochemical effects of the vinca alkaloids-IV Studies with vinleurosine. *Biochem. Pharmac.*, 1969, t. 18, s. 227-232

14. Creasay W. A.: Tumor-inhibitory effects of combinations of the vinca alkaloids with actinomycin D. *Biochem. Pharmac.*, 1966, t. 15, s. 367-375
15. Creasay W. A.: Modifications in biochemical pathways produced by the vinca alkaloids. *Cancer Chemother. Rep.*, 1968, t. 52, s. 501-507
16. Creasay W. A., Markiw M. E.: Biochemical effects of the vinca alkaloids III. The synthesis of ribonucleic acid and the incorporation of aminoacids in Ehrlich ascites cells *in vitro*. *Biochem. biophys. Acta*, 1965, t. 103, s. 635-645
17. Corbett M. K.: Purification of potato virus X without aggregation. *Virology*, 1961, t. 15, s. 8
18. Dawson R. F.: Development of some recent concepts in the physiological chemistry of the tobacco alkaloids. *Plant Physiol* 1946, t. 21 wg „Tytoń — uprawa hodowla fermentacja”, praca zbiorowa, PWRiL, Warszawa 1969, s. 28-31
19. Dijkstra J., van Rensen J. J. S.: Effect of 6-azauracil on infection with tobacco mosaic virus. *Neth. J. Pl. Path.*, 1968, t. 74, s. 193-201
20. Gaümänn E.: Nauka o infekcyjnych chorobach roślin. PWRiL, Warszawa 1959, s. 403
21. Gendron Y., Kassanis B.: The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors. *Ann. appl. Biol.*, 1954, t. 42, s. 183-188
22. Grzeleńska A.: Teoria mechanizmu odporności roślin na choroby infekcyjne. *Post. Bioch.*, 1973, t. 19, z. 1, s. 141-158
23. Gubański M.: Naturalne inhibitory wirusów roślinnych. *Post. Mikrob.*, 1965, t. 4, z. 3, s. 395-407
24. Gubański M.: Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej ze sporyszu (*Claviceps purpurea*). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 1964, z. 4, s. 645-659
25. Hirai T., Shimomura T., Yamaguchi A., Matsui C., Mishikawa Y.: Studies on the chemotherapy for plant diseases. 1957, *Ann. phytopath. Soc.*, t. 22, s. 70-78
26. Hooker W. J., Kim W. S.: Inhibitors of potato virus X in potato leaves with different types of virus resistance. *Phytopath.*, 1962, t. 52, z. 7, s. 688-693
27. Kamińska-Żyła M.: Determination of virus X content in tobacco leaves at different stages of the disease and plant development, as revealed by paper electrophoresis. *Acta biol. crac.*, 1963, t. VI, s. 31-54
28. Kamińska-Żyła M.: Wpływ alkaloidów — efedryny i nikotyny na własności infekcyjne soku z liści tytoniu porażonych wirusem ziemniaczanym X (*Solanum Virus 1*, Smith). *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1972, z. 133, s. 13-22
29. Kamińska-Żyła M.: Porównanie zawartości całkowitego kwasu rybonukleowego w dwóch odmianach tytoniu. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1974, z. 156, s. 11-18
30. Kissling R.: *Tabakkunde. Tabakbau und Tabakfabrikation*, Berlin 1925, wg „Tytoń uprawa hodowla fermentacja” praca zbiorowa. PWRiL, Warszawa 1969, s. 28-31
31. Koelle G.: Kritische Bemerkungen zur Anwendung Statistischen Methoden bei der genetischen Analyse des Inhaltsstoffes Nikotin. *Z. Pfl. Zücht.*, 1965, t. 54, z. 1, s. 61-69
32. Koelle G.: Matroklone Vererbung beim Nikotingehalt des Tabaks und ihr Vergleich mit genbedingten Nikotindifferenzen. *Biol. Zbl.*, 1967, t. 86, z. 6, s. 445-452
33. Koelle G.: Möglichkeiten und Grenzen einer willkürlichen Beeinflussung von Inhaltstoffen am Beispiel des Nikotingehalts von Tabak. *Angew. Bot.*, 1967, t. 41, z. 6, s. 279-282
34. Koelle G.: Der Gendosiseffekt beim Nikotinbau des Tabaks. *Züchter*, 1965, t. 35, z. 5, s. 222-228
35. Koelle G.: Züchtung des Tabaks aus hohen und niedrigen Nikotingehalt. *Adv. Front. pl. Sc.*, 1965, t. 12, s. 77-84

36. Koenig P.: Nikotinverminderung und Nikotinvermehrung in der Tabakpflanze. Z. f. Untersuch. d. Lebensmittel, 1931, wg „Tytoń uprawa hodowla fermentacja” praca zbiorowa. PWRiL, Warszawa 1969, s. 28-31
37. Köhler E.: Über die Beziehung zwischen Viruskonzentration von Impflösungen und Infektionshäufigkeit. III. Der Einfluss infektionshemmender Säfte auf die Infektionsitätsverdünnungskurve. Phytopath., 1957, t. 29, s. 197-203
38. Kozłowska A.: Investigations on the strains of potato virus X in ultraviolet light. Bull. Acad. Pol. Sc., Ser. B, 1950, s. 215-232
39. Kuć J., Henze R. E., Ullstrup A. J., Quachenbusch W. F.: Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with *Helminthosporium carbonum*. J. Amer. Chem. Soc., 1956, t. 38, s. 776-781
40. Kühn H.: Beitrag zur spektrophotometrischen Bestimmung des Nikotins im Tabak und Tabakrauch. Fachl. Mitt. Österr. Tabakregie, 1959, z. 3, s. 1-4
41. Kuntz J. E., Walker J. C.: Virus inhibition by extracts of Spinach. Phytopath., 1947, t. 37, s. 561-579
42. Kupchan S. M., Barbouits S. J., Knox J. R., Lau Cam C. A.: Beta-Solamarine: Tumor Inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. Science., 1965, t. 150, s. 1827-1828
43. Kupchan S. M.: Recent advances in the chemistry of tumor inhibitors of plant origin. Transact. N. Y. Acad. Sc., Ser. II, t. 32, z. 1, s. 85-106
44. Kutsky R. J., Rowlins T. E.: Inhibition of virus multiplication by naphthalene acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by spektrophotometric method. J. Bact., 1950, t. 113, s. 763-780
45. Matusiewicz E.: Wpływ niedoboru i nadmiaru azotu w zależności od wilgotności gleby na rozwój roślin, plon i zawartość nikotyny w machorce. Roczn. Nauk. rol., 1956, t. 72, z. 3, s. 435-448
46. Matusiewicz E.: Rozwój i plonowanie tytoniu w różnych warunkach wilgotności gleby. Roczn. Nauk. rol., 1956, t. 72, z. 3, s. 423-433
47. McKeen C. D.: The inhibitory activity of extract of *Capsicum frutescens* on plant virus infections. Can. J. Bot., 1956, t. 34, s. 891-903
48. Melchers G.: Max Planck-Institut. Tübingen. RFN. 1971, na podstawie ustnej informacji.
49. Mothes K.: Über neue Arbeiten zur Biosynthese der Alkaloide. Die Pharmazie. 1959, t. 14, z. 4, wg „Tytoń — uprawa hodowla fermentacja”, praca zbiorowa, PWRiL, Warszawa 1969, s. 28-31
50. Noble R.L., Beer T. C., Cutts J. H.: Further biological activities of vincaluboblastine—an alkaloid isolated from *Vinca rosea* (L.). Biochem. Pharmac., 1958, t. 1, s. 347-348
51. Noble R. L., Beer C. T., Cutts J. H.: Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1958, t. 76,
52. Nolla J. A. B.: Studies on diseases resistance 1° A tobacco resistant to ordinary mosaic. J. Agric. Univ., Puerto Rico 1935, wg Ghimpu V. — Recherches cytogénétiques des *Nicotina resistants* à la mosaïque, 1942. Nationale Bucuresti wg SEITA Inst. Exp. du Tabac, Bergerac, France.
53. Nolla J. A. B.: 2° Description of tobacco strains resistant to ordinary tobacco mosaic. 1939 (wg poz. 52)
54. Nowacki E.: Koewolucja roślin i zwierząt. Wszechświat, 1974, z. 7-8, s. 169-173
55. Potty V.: Determination of proteins in the presence of phenols and proteins. Analyt. Biochem., 1969, t. 29, z. 3, s. 535-539
56. Płatek J.: Badania na tytoniem krajowym. III Główne alkaloidy i ich wystę-



- powanie w niektórych odmianach przemysłowych. Chem. analit., 1964, t. 9, s. 107-112
57. Robinson P.; The Biochemistry of Alkaloids. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York 1968, s. 20
58. Ryżkow W.P., Smirnova W. A., Gorodskoja O. S.: Biochimia, 1946, t. 11, z. 3, s. 197
59. Schimomoura T.: Necrosis and localisation of infection in local lesion hosts. Phytopath., Z. 1971, t. 70, s. 185-196
60. Schlegel D. E., Rawlins T. E.: A screening of the effect of organic compound on production of tobacco mosaic virus J. Bact., 1954, t. 67, s. 103-109
61. Schneider I. R.: The effect of purines, purine analogs and related compounds on the multiplication of tobacco mosaic virus. Phytopath., 1954, t. 44, z. 5, s. 243-247
62. Schneider I. R.: Solution of TMV in the aqueous phase of chloroform water emulsion and application of this phenomenon in virus assay. Science, 1953, t. 117, s. 20-32
63. Schuster G.: Die Auswirkungen von Virusinfection und Tageslänge auf den Alkaloidgehalt unterschiedlich photoperiodisch empfindlicher Pflanzen der Gattung *Nicotiana* L. Biol. Beitr., 1962, t. 1, z. 4, s. 265-272
64. Schuster G.: Untersuchungen über die Ursachen der virusinduzierten Veränderungen des Alkaloidgehaltes der Blätter verschiedener *Nicotiana*-Arten und -Sorten. Ber. Inst. Tabakforsch., 1966, t. 13, z. 2, s. 116-128
65. Schuster G.: Investigations into the causes of virus-induced variations in the alkaloid content of the leaves of various *Nicotiana species*. Proc. forth Internat. Tobacco Scient. Congress, Athens 1966, s. 487-492
66. Silberschmidt K.: Der Einfluss der Mosaik-Krankheit auf den Nikotin Gehalt der Tabakspflanze. Ber. dt. bot. Ges., 1930, t. 48, z. 1, s. 122-129
67. Simons J. N., Ewidler R., Moss L. M.: Succulent-type plants as sources of plant virus inhibitor. Phytopath., 1963, t. 53, s. 677-683
68. Sinden S. L., Goth R. W., O'Brien M. J.: Effect of potato alkaloids on the growth of *Alternaria solani* and their possible role as resistance factors in potatoes Phytopath., 1973, t. 63, z. 2, s. 303-307
69. Uteh M. N., Johnson J.: The inactivation of plant viruses by substances obtained from bacteria and fungi. Phytopath., 1950, t. 40, s. 247-255
70. Verma V. S., Raychaudhuri S.P.: Properties and nature of inhibitors of potato virus X in four medicinal plant extracts. Biol. Plant., Praha 1969, 11 z. 5, s. 384-387
71. Verma V. S., Raychaudhuri S. P.: Chemicals from *Emblica officinalis* Gaertn. as inhibitors of Potato virus X. Zentbl. Bakt. Parasit Kole. II., 1970, t. 124, z. 5, s. 393-398
72. Verma V. S., Raychaudhuri S. P., Khan A. M.: Effect of medicinal plant extracts on the infectivity of potato virus X. Planta Med. Z. Arzneipfl.forsch., 1970, t. 18, z. 2, s. 179-184
73. Verma V. S., Raychaudhuri S.P.: Effect of tannins from *Terminalia chebula* Retz. on the infectivity of potato virus X. Acta microb. pol. Ser. B, 1970, t. 2, z. 19, s. 127-132

Мария Каменьска-Жила

## ВЛИЯНИЕ АЛКАЛОИДОВ НА РАЗМНОЖЕНИЕ X ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ В ЛИСТЯХ ТАБАКА

### Резюме

В 1966-1974 гг проводились опыты по влиянию алкалоидов на размножение X вируса картофеля в растениях табака. В качестве растительного материала применены сорта *Nicotiana tabacum*: Уайт Бурлей, Амбалема Бергерак, Амбалема Гемблукс. В качестве тест-растения для X вируса картофеля применялись: *Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. Исследовано тормозящее влияние трех алкалоидов: никотина, норникотина и эфедрина. Два первые вещества принадлежат к алкалоидам появляющимся в табаке, эфедрин же является представителем, так наз. протоалкалоидов. Вышеперечисленные алкалоиды были исследованы как ингибиторы размножения X вируса, а также как ингибиторы инфекции. Тормозящий эффект этих алкалоидов на X вирус картофеля исследовался с помощью биологических и биохимических тестов. В некоторых случаях установлено 70% как средний процент торможения. Можно предполагать, что существует некоторая корреляция между воспричивостью к заражению X вирусом картофеля, а количеством никотина, накапливаемого в растении, однако это явление нерегулярное. Предприняты попытки объяснения двунаправленных генетических скрещиваний между сортами вида *Nicotiana tabacum*: Амбалема Бергерак и Амбалема Гемблукс, отличающихся содержанием никотина и восприимчивостью к инфекции X вирусом. Получено поколение F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub>. В поколении F<sub>2</sub> наблюдалось расщепление признаков устойчивости в отношении 1:30. Дальнейшие пробы прерваны ввиду отсутствия условий для проведения опытов. Разные результаты определений по содержанию никотина в листьях табака, из отдельных серий опытов, выполненных в трех разных теплицах были вероятно связаны с иными условиями микроклимата.

Maria Kamińska-Zyła

## THE EFFECT OF ALKALOIDS ON POTATO VIRUS X MULTIPLICATION IN TOBACCO LEAVES

### Summary

Some experiments on the effect of alkaloids on multiplication of potato virus X were carried out in 1966-1974. The following test plants were used: *Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, and four varieties of *Nicotiana tabacum*: White Burley, Xanthi, Ambalema Bergerac and Ambalema Gembloux. The inhibitory effect of three alkaloids: nicotine, nor-nicotine and ephedrine was tested. The first two of them occur in tobacco, while ephedrine belongs to so called protoalkaloids. These alkaloids were tested as both inhibitors of virus X multiplication and inhibitors of infection. Biological and biochemical tests were used. In some tests the inhibitory effect reached 70%, on the average. It can be suggested that there is a correlation between the susceptibility of plants to the infection with potato virus X and the content of nicotine

in their cells, although this is not a regular relationship. To explain the inhibitory effect of nicotine on virus X multiplication, two varieties of *Nicotiana tabacum*, Ambalema Bergerac and Ambalema Gembloux, which differ in the content of nicotine and susceptibility to the infection with virus X, were generatively crossed. Two generations, F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>, were obtained. In the F<sub>2</sub> the resistant plants occurred in the proportion 1:30. Differences in the content of nicotine among tobacco leaves used in the series of experiments in three various greenhouses probably resulted from the differences in microclimate.