

WPŁYW SULFOTLENKU DWUMETYLU NA SYNTEZĘ WIRUSA MOZAIKI TYTONIU W KRAŻKACH WYCIĘTYCH Z LIŚCI *NICOTIANA TABACUM* VAR. SAMSUN

Lucyna Wajda, Bożena Czuber

Pracownia Wirusologii ZFR PAN, Kraków

Sulfotlenek dwumetylu (DMSO) jest płynem słabo zasadowym, dipolarnym, działającym silnie na błony cytoplazmatyczne zarówno komórek zwierzęcych jak i roślinnych. Własności fizyko-chemiczne tego związku omawiane są w literaturze.

Z dotychczasowych badań wynika, że związek ten zmienia przepuszczalność błon cytoplazmatycznych zwiększając ich przenikliwość dla różnych związków chemicznych trudno wnikających do komórek, czy też tkanek [3, 5, 8, 16], oraz oddziałuje w bardzo szerokim zakresie na różne układy biologiczne [9, 14, 15].

Badania ostatnich lat wykazały, że DMSO wpływa na metabolizm zwierząt i roślin poddanych jego działaniu [17]. Ze względu na swoje właściwości fizyko-chemiczne i stosunkowo niewielką toksyczność znalazł szerokie zastosowanie w medycynie, biologii, weterynarii, a ostatnio i w rolnictwie.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono badaniom związanym z fizjologicznym działaniem sulfotlenku dwumetylu na tkanki zwierzęce hodowane w kulturach tkankowych [3], na bakterie [8, 10] oraz na wirusy zwierzęce [1, 2, 11]. Jak dotąd niewiele prac poświęconych było badaniom nad wpływem DMSO na metabolizm roślin zdrowych jak też i porażonych wirusami roślinnymi.

Praca niniejsza omawia pierwszą część doświadczeń przeprowadzonych z różnymi koncentracjami DMSO, na których hodowano krążki wycięte z liści tytoniu zakażonego wirusem mozaiki tytoniu.

Celem pracy było zbadanie wpływu różnych koncentracji DMSO na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniu oraz wpływu tego związku na zakaźność wirusa.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na liściach tytoniu odmiany Samsun w stadium 9 liści (nie licząc liści młodocianych). Liście tych roślin opylano karborundem i inokulowano zawiesiną wirusa mozaiki tytoniu w koncentracji 0,05%. Następnego dnia wycinano z nich krążki o średnicy 16 mm, ważono je i układano do szalek napełnionych pożywką z sacharozą (kontrola), lub pożywką z dodatkiem DMSO w różnych koncentracjach. W każdej szalce znajdowało się 15 ml płynu i 15 krążków, pochodzących z liści kolejnych pięt, a więc różnego wieku. Jako pierwszy oznaczano liść najmłodszy, a jako ósmy liść najstarszy. Szalki wraz z krążkami hodowano w komorach o stałym oświetleniu i stałej temp. $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$. Po trzech dniach krążki płukano w bieżącej wodzie przez 15 min, osuszano delikatnie w bibule filtracyjnej, ponownie ważono, a następnie rozcierano w moździerzu z wodą wodociągową w stosunku 1:10 i wirowano przez 15 min przy 3000 obr./min. Część odwirowanego soku rozcieńczano wodą wodociągową 1:1000 i inokulowano nim liście rośliny testowej *Nicotiana glutinosa*. W pozostałym soku zawartość wirusa mozaiki tytoniu oznaczono metodą Taniguchi [18]. Zawartość wirusa podawano w mg/ml.

W testach infekcyjności liczbę plamek uzyskanych na liściach roślin testowych przeliczano na 1 cm², lub podawano procent zahamowania zakaźności wirusa, jeżeli szczepiono połówki liści sokiem z krążków kontrolnych i sokiem z roślin testowych, czyli sokiem z krążków hodowanych na różnych koncentracjach DMSO.

W doświadczeniach użyto następujących koncentracji DMSO: 1:5, 1:10, 1:20 i 1:40, co wynosiło odpowiednio 20%, 10%, 5% i 2,5%. Doświadczenia przeprowadzano na liściach różnego wieku, w celu stwierdzenia, czy DMSO oddziałuje jednakowo na tkanki liści różnego wieku.

WYNIKI

Obserwacje makroskopowe krążków dokonane w toku doświadczeń wykazały, że krążki hodowane w najwyższej koncentracji DMSO wynoszącej 20% (stęż. 1:5) były jasnozielone, cienkie i bardzo wiotkie. Płyn zaś, na którym je hodowano miał barwę zieloną. Na krążkach hodowanych w 10% DMSO objawy takie wystąpiły w stopniu znacznie słabszym, zaś krążki hodowane w najniższych użytych w doświadczeniach koncentracjach DMSO nie różniły się wyglądem od krążków kontrolnych. Opisane zmiany w wyglądzie zewnętrznym krążków poddanych działaniu silnych dawek DMSO wydają się być wynikiem ich toksycznego działania na tkanki liści.

Zmiany zaobserwowane w wyglądzie zewnętrznym krążków poddanych działaniu wyższych koncentracji DMSO znalazły swoje odbicie w ich ciężarze. Po trzech dniach hodowania krążków w tych dawkach DMSO

wystąpił ubytek ciężaru krążków w stosunku do ciężaru początkowego, jak też znaczny spadek ciężaru w stosunku do ciężaru krążków kontrolnych. Dane liczbowe dotyczące tego zjawiska zestawiono w tab. 1 i 2. Najmniejsze różnice w ciężarze krążków dały się zaobserwować w najniższej koncentracji DMSO wynoszącej 2,5%, są one zbliżone do kontroli. Przedstawione w tab. 1 i 2 liczby wydają się świadczyć, że najniższe koncentracje DMSO wywierają znacznie słabszy efekt toksyczny, a toksyczność szybko maleje wraz z obniżaniem koncentracji DMSO. Wnosić o tym można z przyrostu ciężaru krążków po trzech dniach hodowania ich na różnych koncentracjach DMSO.

Dane liczbowe przedstawiające ilość wirusa w poszczególnych krążkach pochodzących z różnych liści i hodowanych w różnych koncentracjach DMSO również zebrane są w tab. 1 i 2. Liczby te dotyczą oznaczeń spektrofotometrycznych wirusa w soku badanych krążków i przedstawione są w mg wirusa w 1 ml soku. Z podanych w tab. 1 i 2 liczb wynika, że w krążkach hodowanych w najsilniejszych koncentracjach DMSO wynoszących 20% i 10%, wirusa mozaiki tytoniu było najmniej w porównaniu z kontrolą. Średnio stanowiło to od ok. 20% do 50% tej ilości, jaką stwierdzano w krążkach kontrolnych. Obniżenie zawartości wirusa

Tabela 1

Porównanie ciężaru, infekcyjności i zawartości wirusa mozaiki tytoniu w krążkach kontrolnych i poddanych działaniu 20% sulfotlenku dwumetylu

Liść	Rodzaj pożywki	Ciężar krążków w mg			Średnia liczba plamek na 1 cm ²	TMV mg/ml	% zahamo- wania
		począ- tkowy	końcowy	różnica			
1	kontrola	770	1190	+420	4,8	0,2765	98
	DMSO	790	662	-138	0,07	0,1793	
2	kontrola	468	690	+222	13,1	0,2415	96
	DMSO	468	458	-10	1,1	0,1345	
3	kontrola	460	690	+230	12,0	0,1860	97
	DMSO	466	474	+8	0,7	0,0727	
4	kontrola	484	728	+224	5,1	0,1755	95
	DMSO	490	500	+10	0,2	0,0660	
5	kontrola	580	876	+296	3,1	0,1630	90
	DMSO	580	548	-32	0,3	0,0536	
6	kontrola	632	892	+260	2,7	0,1560	59
	DMSO	634	562	-72	0,3	0,0500	
7	kontrola	784	1026	+242	1,9	0,1530	92
	DMSO	778	634	-114	0,2	0,0362	
8	kontrola	640	858	+218	0,9	0,1410	68
	DMSO	620	538	-82	0,07	0,0222	

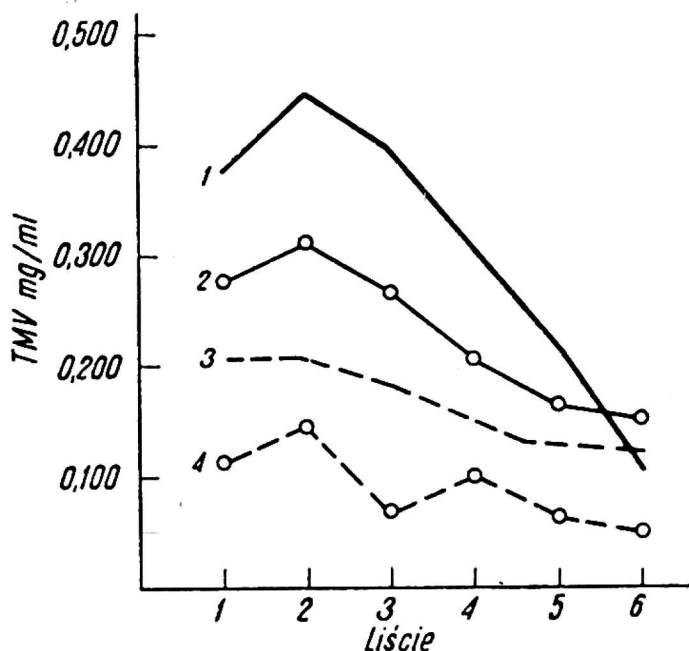
było mniej więcej jednakowe we wszystkich badanych krążkach bez względu na wiek liści, z których wycinano krążki.

Tabela 2

Porównanie ciężaru, infekcyjności oraz zawartości wirusa w krążkach kontrolnych i poddanych działaniu różnych koncentracji sulfotlenku dwumetylu

Liść	Rodzaj pożywki	Ciężar krążków w mg			TMV mg/ml	% zahamowania
		początkowy	końcowy	różnica		
1	kontrola	366	692	+326	0,376	100,0
	DMSO 1:10	344	287	-57	0,115	
	DMSO 1:20	355	477	+122	0,202	
	DMSO 1:40	320	563	+243	0,276	
2	kontrola	271	496	+225	0,444	99,0
	DMSO 1:10	266	235	-31	0,149	
	DMSO 1:20	267	379	+112	0,152	
	DMSO 1:40	254	454	+200	0,309	
3	kontrola	302	454	+152	0,398	98,8
	DMSO 1:10	303	183	-120	0,069	
	DMSO 1:20	302	390	+88	0,131	
	DMSO 1:40	303	425	+122	0,269	
4	kontrola	328	467	+139	0,305	100,0
	DMSO 1:10	331	158	-173	0,100	
	DMSO 1:20	330	343	+13	0,158	
	DMSO 1:40	300	453	+155	0,206	
5	kontrola	386	536	+150	0,216	98,8
	DMSO 1:10	357	225	-132	0,067	
	DMSO 1:20	395	386	-9	0,181	
	DMSO 1:40	381	468	+87	0,166	
6	kontrola	366	526	+160	0,106	99,4
	DMSO 1:10	375	255	-120	0,051	
	DMSO 1:20	367	336	-31	0,125	
	DMSO 1:40	383	474	+91	0,151	

Na rys. 1 przedstawiono krzywe zawartości wirusa w krążkach pochodzących z liści różnego wieku i hodowane w różnych koncentracjach DMSO. Należy podkreślić, że przebieg tych krzywych jest we wszystkich koncentracjach podobny, ale zawartość wirusa jest różna, tym wyższa, im niższa była dawka DMSO, na której hodowano krążki. W toku przeprowadzanych doświadczeń nie stwierdzono większych różnic w reakcji liści różnego wieku na DMSO. Wszystkie badane liście reagowały zmniejszeniem się zawartości wirusa, przy czym zawartość wirusa mozaiki tytoniu w liściach starszych była bardziej zbliżona do zawartości wirusa w krążkach z liści kontrolnych. Spadek zawartości wirusa w krążkach

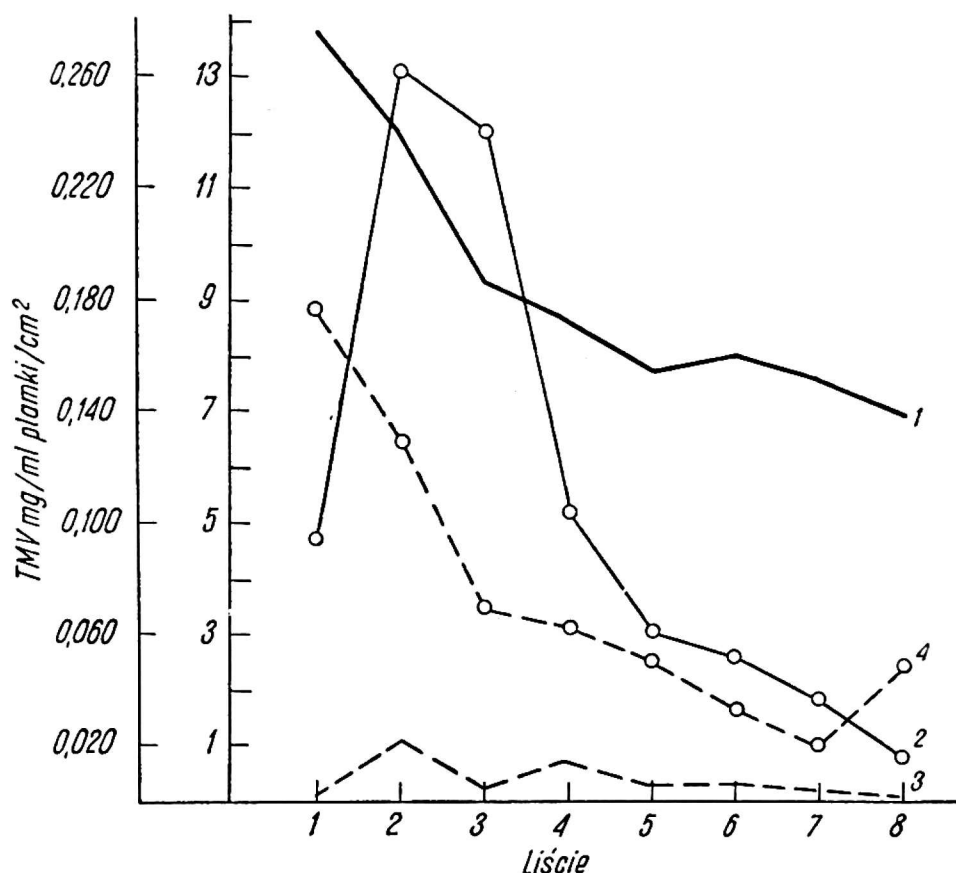


Rys. 1. Porównanie zawartości wirusa mozaiki tytoniu w krążkach kontrolnych i poddanych działaniu różnych koncentracji sulfotlenku dwumetylu
 1 — zawartość wirusa w mg/ml w krążkach kontrolnych, 2 — zawartość wirusa w mg/ml w krążkach poddanych działaniu sulfotlenku dwumetylu w konc. 1:40 (2,5%), 3 — zawartość wirusa w mg/ml w krążkach poddanych działaniu 5% sulfotlenku dwumetylu, 4 — zawartość wirusa mozaiki tytoniu w mg/ml w krążkach poddanych działaniu 10% roztworu sulfotlenku dwumetylu

hodowanych na DMSO był najniższy w liściach najmłodszych, a w miarę tego, im starsze liście brano do doświadczeń, spadek ten był coraz niższy i w liściach starszych 5 i 6 niewiele się różnił od kontroli. Widać to zwłaszcza w koncentracji DMSO wynoszącej 10% i 5%.

Zakaźność uzyskanych preparatów wirusowych w toku przeprowadzanych doświadczeń była bardzo niska, a procent zahamowania w testach infekcyjnych dochodził nawet do 100%. Odpowiednie liczby ilustrujące te zjawiska zamieszczone są również w tab. 1 i 2.

Z porównania krzywych obrazujących zawartości wirusa i jego zakaźność w kolejnych liściach (rys. 2) wynika, że istnieje duża rozpiętość pomiędzy zawartością wirusa, oznaczoną spektrofotometrycznie, a jego zakaźnością badaną przy pomocy testów biologicznych. Należy podkreślić, że podobna różnica pomiędzy zawartością wirusa oznaczoną spektrofotometrycznie, a jego zakaźnością dała się stwierdzić i w kontroli. Najwyższą zakaźność wykazuje sok pochodzący z liści 2 i 3, a więc liści młodszych dobrze już rozwiniętych. Sok liści 4 i następnych wykazuje gwałtowny spadek zakaźności, podczas gdy zawartość wirusa w tych liściach oznaczana spektrofotometrycznie wykazuje raczej bardzo powolny i łagodny spadek krzywej (rys. 2). Natomiast w krążkach wyciętych z liści różnego wieku i hodowanych w najwyższej koncentracji DMSO, wynoszącej 20% zakaźność soku była prawie równa zero, podczas gdy zawartość wirusa oznaczana spektrofotometrycznie wynosiła mniej więcej $\frac{1}{3}$ tej ilości, jaką stwierdzono w kontroli. Wyniki tych doświadczeń przedstawia rys. 2. Charakter krzywej uzyskanej z krążków poddanych działaniu DMSO



Rys. 2. Porównanie zawartości wirusa mozaiki tytoniu oraz jego zakaźności w krążkach kontrolnych i poddanych działaniu 20% roztworu sulfotlenku dwumetylu

1 — zawartość wirusa mozaiki tytoniu w krążkach kontrolnych, 2 — zakaźność wirusa mozaiki tytoniu w soku krążków kontrolnych, 3 — zawartość wirusa mozaiki tytoniu w krążkach poddanych działaniu 20% sulfotlenku dwumetylu, 4 — zakaźność wirusa mozaiki tytoniu w soku krążków poddanych działaniu 20% sulfotlenku dwumetylu

w koncentracji 20% jest bardzo podobny do krzywej uzyskanej z krążków kontroli, ale znacznie obniżona jest ich wartość liczbowa, co wydaje się świadczyć o małej zawartości wirusa w soku tych krążków.

Z dotychczasowych obserwacji wydaje się wynikać, że DMSO jest związkiem o wiele mniej toksycznym w porównaniu z wieloma innymi substancjami chemicznymi. Dawki DMSO wywołujące wyraźne objawy trującego działania są wielokrotnie wyższe niż dało się to stwierdzić dla wielu innych związków chemicznych różnego typu. Dawki trujące DMSO dla komórek zwierzęcych są wielokrotnie niższe i zaczynają się już od koncentracji 1%, zaś dawki działające trująco na tkanki roślinne są wielokrotnie wyższe i wynoszą np. dla *Datura sp.* 5% [17], a dla traw 6%. Dla trzyletnich siewek brzoskwiń 7,8% roztwór DMSO wywoływał już wyraźne objawy toksyczne, zaś 3,9% roztwór działał toksycznie tylko przez pewien czas [12]. Te różnice w działaniu różnych koncentracji DMSO wydają się być spowodowane wieloma czynnikami, jak: różnymi metodami podawania roślinom DMSO (spryskiwanie, dodawanie do pożywek, podlewanie roztworami wodnymi ziemi itp.), a także różną wrażliwością samych roślin w obrębie jednego gatunku.

Uzyskane w toku naszych doświadczeń wyniki sugerują, że DMSO

obniża namnażanie się wirusa TMV w krążkach wyciętych z liści tytoniu odmiany Samsun. Cochran i współpracownicy [4] podają, że koncentracje DMSO poniżej 20% nie wpływają na zakaźność TMV, a dopiero koncentracje pomiędzy 20%—60% wyraźnie zmieniają zakaźność tego wirusa, przy czym różnice są zależne od koncentracji DMSO. Pine [13] stwierdził, że DMSO powoduje obniżenie powstawania liczby plamek nekrotycznych na roślinach testowych, które były nim spryskiwane lub podlewane. Takie obniżenie otrzymano w koncentracjach od 0,005—1%, przy czym koncentracje te nie wywoływały objawów toksycznych. Należy podkreślić, że stopień zahamowania jest inny na *Nicotiana glutinosa*, a inny na *Chenopodium amaranticolor*.

Również i u fasoli efekt działania DMSO na tworzenie się plamek nekrotycznych po inokulacji wirusem mozaiki tytoniu jest różny i w dużym stopniu zależy od odmiany. Jednocześnie autorzy ci wykazali, że DMSO wpływa na pobieranie manganu z pożywki i że istnieje zależność pomiędzy powstawaniem plamek, a pobieraniem manganu [6]. Jak wykazano, DMSO ma wpływ wyraźnie hamujący na kiełkowanie ziarn pyłku i jak przypuszczają autorzy, wpływa na wydłużanie się łągiewki pyłkowej [7].

Z literatury wiadomo, że DMSO zwiększa zakaźność RNA wirusowego niektórych wirusów zwierzęcych [19, 20]. Te wielostronne działania sulfotlenku dwumetylu wydają się mieć wpływ na niektóre etapy syntezy wirusowej w obrębie komórek roślinnych i jako takie stanowią ciekawy przedmiot badań.

LITERATURA

1. Amstey M. S.: Enhancement of polio-RNA infectivity with dimethylsulfoxide. *Feder. Proc.* 1966, t. 25, s. 492
2. Amstey M. S., Parkman P. D.: Enhancement of polio-RNA infectivity by DMSO. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1966, t. 123, s. 438—442
3. Bickis I. J., Kazaks K., Finn J. J., Henderson J. W. D.: Permeation kinetics of glycerol and dimethylsulfoxide in Novikoff hepatoma ascites cells. *Cryobiology* 1967, z. 4, s. 1—10
4. Cochran W., Dhalival A. S., Forghani B., Chidester J. L., Dhalival C. K., Lamborn C. R.: Action of dimethylsulfoxide on tobacco mosaic virus. *Phytopath.* 1967, t. 57, s. 97
5. Cotton F. A., Francis R.: Sulfoxides as ligands. A preliminary survey of methyl sulfoxide complexes. *J. Am. chem. Soc.* 1959, t. 82, s. 2986—2991
6. Dhalival A. S., Rudd T. A.: Effect of manganese and dimethylsulfoxide on the development of tobacco mosaic virus local lesions in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopath.* 1970, t. 60, s. 1178—1182
7. Dickson D. B., Cochran D.: Dimethyl sulfoxide: Reversible inhibitor of pollen tube growth. *Plant Physiol.* 1968, t. 43, s. 411—416
8. Flower A. V., Zabin I.: Effects of dimethyl sulfoxide on the lactose operon in *Escherichia coli*. *J. Bact.* 1966, t. 92, s. 353—357
9. Hellman A., Farrelly J. G., Martin D. H.: Some biological properties of dimethyl sulfoxide. *Nature* 1967, t. 213, s. 982—985

10. Karabin L. A.: Wpływ dezoksyholanu sodu, dwumetylosulfotlenku (DMSO) na wzrost *Ashbya gossypil* i syntezę ryboflawiny. Acta microb. pol. 1968, t. 17
11. Kisch A. L.: Dimethyl sulfoxide enhancement of transformation by polyoma virus. Virology 1969, t. 37, s. 32—41
12. Pine T. S.: Reactions of peach trees and peach tree viruses to treatment with dimethyl sulfoxide and other chemicals. Phytopath. 1967, t. 57, s. 671—673
13. Pine T. S.: Effect of dimethyl sulfoxide on tobacco mosaic. Plant Dis. Repr. 1968, t. 52, s. 61—63
14. Rammler D. H., Zaffaroni A.: Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1967, z. 141, s. 13—23
15. Rammler D. H.: The effect of DMSO on several enzyme systems. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1967, z. 141, s. 291—299
16. Ranky W. O., Nelson D. C.: Dimethyl sulfoxide. Organic Sulfur Compounds. N. Kharasch 1961, s. 107—182
17. Schiuchetti L. A.: The effect of DMSO alone and when combined with various growth regulators on the growth and metabolic products of *Datura* sp. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1967, z. 141, s. 139—147
18. Taniguchi T.: A rapid method for microanalytical determination of the amount of TMV in plant tissues. Nature 1962, t. 194, s. 708
19. Tovell D. R., Colter J. S.: Observations on the assay of infections viral ribonucleic acid: Effect of DMSO and DEAE-dextran. Virology 1967, t. 32, s. 84—92
20. Tovell D. R., Colter J. S.: The interaction of tritiumlabelled Mengo virus RNA and L cells: The effects of DMSO and DEAE-dextran. Virology 1969, t. 37, s. 624—631

Люцина Вайда, Боżена Чубер

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФООКИСИ ДИМЕТИЛА НА СИНТЕЗ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА В КРУЖКАХ, ВЫРЕЗАННЫХ ИЗ ЛИСТЬЕВ

Резюме

В ходе работы показано задерживание размножения вируса мозаики табака в кружках листьев разного возраста, под влиянием действия сульфоокиси диметила. Более высокие дозы имели одновременно токсическое действие. Эффект задерживания заметно зависит от концентрации сульфоокиси диметила. Также кажется, что исследуемое соединение снижает инфекционность вируса даже в более слабых концентрациях.

Lucyna Wajda, Bożena Czuber

THE INFLUENCE OF DMSO ON THE SYNTHESIS OF TOBACCO MOSAIC VIRUS IN DISCS CUT OUT FROM LEAVES OF *NICOTIANA TABACUM* VAR. SAMSUN

Summary

The paper presents the results of experiments involving study of the influence of DMSO on the multiplication of TMV in discs cut out from leaves of tobacco var. Samsun.

It results from the experiments that DMSO inhibits the multiplication of TMV. Concentrations higher than 5% were toxic for examined tissues.