

## WPŁYW ALKALOIDÓW — EFEDRYNY I NIKOTYNY NA WŁASNOŚCI INFEKCYJNE SOKU Z LIŚCI TYTONIU, PORĄŻONYCH WIRUSEM ZIEMNIACZANYM X (*SOLANUM VIRUS* 1, SMITH)

*Maria Kamieńska-Żyła*

Pracownia Wirusologii Zakł. Fizjologii Roślin PAN

Schlegel i Rawlins [7] badali wpływ wielu związków organicznych, między innymi alkaloidów na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniowej w liściach tytoniu odmiany Trelease. Do doświadczeń użyli trzech alkaloidów: efedryny, chininy i kolchicyny. Stwierdzili, że dwa pierwsze wykazywały słaby wpływ stymulujący na namnażanie się TMV, natomiast kolchicina hamowała w przybliżeniu w 25% rozwój tego wirusa. Schneider [8] przebadał w tym samym aspekcie wiele różnych związków chemicznych, a także alkaloidy kofeinę, teobrominę i teofilinę. Wykazał on, że wpływ tych trzech alkaloidów na namnażanie się wirusa mozaiki tytoniowej był albo lekko hamujący, albo też stymulujący. W wypadku kofeiny i teofiliny zależało to od koncentracji tych związków w badanym roztworze.

Bobyry [1] zbadał wpływ ponad 60 alkaloidów na wirusa TMV. Autor wykazał, że najbardziej aktywnymi okazały się diuretyna, chlorowodorek chininy i lycopodyna. Powodowały one hamowanie namnażania się wirusa w granicach od 73 do 92%.

Gubański [2, 3] obserwując wpływ wyciągów ze sporyszu na wirusa mozaiki tytoniu stwierdził, że alkaloidy sporyszu nie posiadają własności antywirusowych.

W kilku przytoczonych powyżej publikacjach doświadczenia nad wpływem alkaloidów na namnażanie się wirusów roślinnych prowadzono z wirusem mozaiki tytoniowej.

W niniejszej pracy przedmiotem badań był ziemniaczany wirus X, a materiałem zakażone tym wirusem liście tytoniu. Metodą testu biologicznego przebadano wpływ dwóch alkaloidów: nikotyny — typowego przedstawiciela alkaloidów tytoniowych i efedryny jako alkaloidu nietytoniowego, typu protoalkaloidów [5].

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na siewkach *Nicotiana tabacum* L. odm. White Burley, *Gomphrena globosa* L. i *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., których użyto jako roślin testowych dla ziemniaczanego wirusa X. Siewki tytoniu używane do testów były w stadium 8 do 10 dobrze rozwiniętych liści. Rośliny *Gomphrena globosa* L. miały zwykle rozwinięte trzy piętra liści. Liście czwartego piętra były w stadium rozwoju. Przeznaczone do testów rośliny *Chenopodium amaranticolor* posiadały od 8 do 10 liści. Doświadczenia prowadzono w kilku terminach: na wiosnę, w lecie i w jesieni. Wszystkie rośliny testowe hodowano w szklarni w doniczkach ze sterylizowaną ziemią.

Materiał do infekcji w doświadczeniach z efedryną i nikotyną stanowił sok uzyskany z krążków wyciętych z szóstych liści (licząc od nasady rośliny) *Nicotiana tabacum* L. odm. White Burley i Xanthi, zakażonych wirusem ziemniaczanym X, nekrotyczny szczep S [6, 9]. Krążki wycinano korkoborem, po 24 godzinach od zakażenia liści wirusem i umieszczano je w szalkach Petriego, na pożywce z dodatkiem alkaloidów o kilku różnych stężeniach. Kontrolę stanowiły krążki zanurzone w pożywce pozbawionej alkaloidów. Pożywka ta miała następujący skład: 20 g sacharozy, 0,2 g fosforanu wapnia jednozasadowego i 0,3 g sulfanilamidu w 1000 ml wody destylowanej.

Krążki przetrzymywano w roztworach przez 4 dni, przy czym pożywki codziennie wymieniano na świeże. Po upływie tego czasu krążki przemywano dokładnie wodą destylowaną, osuszano na bibule filtracyjnej i wyciskano z nich sok. Sok ten odwirowywano przy 3500 obr/min. przez 20 minut i rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1 : 5. Tak przygotowanym inokulatem zakażano liście roślin testowych. W przypadku *N. tabacum* i *C. amaranticolor* zastosowano metodę zakażenia połówek liściowych tzn. jedną połówkę infekowano sokiem wyciśniętym z krążków hodowanych na pożywce z dodatkiem alkaloidu, a drugą sokiem z krążków hodowanych na pożywce kontrolnej. W doświadczeniach z *G. globosa* L. zakażano liście na kilku piętrach. Na danym piętrze (licząc zawsze od nasady rośliny) inokulowano jeden liść sokiem z krążków moczonych w pożywce z alkaloidem, a naprzeciwległy sokiem z krążków kontrolnych.

Na liściach tytoniu licząco plamki (local lesions) na obydwu połówkach oddzielnie, po upływie czterech do pięciu dni, w świetle lampy UV [4], względnie w świetle dziennym. Charakterystyczne, wyraźne, otoczone czerwoną obwódką plamki na *G. globosa* L. licząco w świetle dziennym po upływie pięciu do siedmiu dni od chwili zakażenia. Analogicznie postępowano z roślinami *C. amaranticolor*.

## WYNIKI

## DOŚWIADCZENIA Z EFEDRYNĄ

W pierwszej serii badań użyto roztwór efedryny o koncentracji 0,05%. Rośliną testową była *N. tabacum* L. odm. White Burley. Przeprowadzono 7 doświadczeń w terminie od stycznia do kwietnia 1967 r. Z każdego doświadczenia wyliczono średnie liczby plamek dla testu i kontroli. Obrazuje to poniższa tabela.

Tabela 1

Średnie liczby plam lokalnych na połówkach szóstych liści *N. tabacum* odm. White Burley

Data	0,05% efedryna		% hamowania
	kontrola	test	
1967 r.			
17 I	40,60	18,00	55,66
18 II	29,40	15,40	47,62
27 II	17,80	10,80	39,32
7 IV	45,87	29,12	36,52
7 IV	28,62	22,25	22,26
17 IV	19,20	6,20	67,71
17 IV	21,20	10,00	52,83
Średnia generalna	28,96	15,97	45,99
Różnica		12,99	
Przedział ufności		7,91	
(P = 0,01)			

Przy rozpatrywaniu wszystkich wyników zastosowano wzór Uteha i Johnsona [10], według którego obliczono procent hamowania infekcyjności „soku wirusowego”. Dla trzech roślin testowych osobno obliczano pełną analizę zmienności, co pozwoliło na statystyczne udowodnienie istotności różnic między liczbą plamek w obydwu obiektach — testowym i kontrolnym.

Jak widać z tab. 1 efedryna wywiera duży wpływ hamujący na namnażanie się wirusa ziemniaczanego X w połówkach szóstych liści siewek *N. tabacum* L. odm. White Burley, co wyraża się średnim procentem hamowania równym 45,99. Generalna średnia liczba plam obiektu kontrolnego wynosi 28,96, a testowych 15,97. Istotność różnicy między tymi średnimi, wynoszącej 12,99 została udowodniona statystycznie z prawdopodobieństwem 0,99, przy przedziale ufności 7,91.

Przeprowadzono również 3 doświadczenia na *C. amaranticolor*. Zastosowano 2 stężenia efedryny — 0,2 i 0,02%. Wyniki obrazuje tab 2.

I tutaj uwidacznia się hamujący wpływ alkaloidu na wirusa. Średni procent hamowania przy stężeniu efedryny 0,2% wynosi 40,07, zaś przy

Tabela 2

Średnie liczby plam lokalnych na połówkach liści *C. amaranticolor*

Data	0,2% efedryna		% hamowania	0,02% efedryna		% hamowania
	kontrola	test		kontrola	test	
1969 r.						
1 VII	46,75	28,25	53,15	50,25	29,00	42,29
11 IX	7,60	3,80	50,00	5,60	4,80	14,28
6 X	25,80	21,40	17,05	24,00	11,20	53,33
Średni % hamowania			40,07			36,63
Średnia generalna:	kontrola — 26,67			test — 16,41		
Różnica			10,26			
Przedział ufności			6,18			
(P = 0,05)						

stężeniu 0,02% — 36,63. Przy wyższej koncentracji efedryny różnica w liczbie plam lokalnych między kontrolą a testem wynosiła 8,90, przy niższej 11,62. W obydwu wypadkach różnice te były istotne przy prawdopodobieństwie 0,95, z przedziałem ufności równym 6,18.

Dziwnym wydaje się fakt, że nie stwierdzono żadnych wyraźnych różnic w procentach hamowania namnażania się wirusa X w zależności od stężenia alkaloidu.

Liście trzeciego piętra roślin *G. globosa* L. zakażano sokiem z krążków zanurzanych w roztworach zawierających 0,1 i 0,01% efedryny. Przeprowadzono pięć doświadczeń, w tym jedno w terminie jesiennym. Średnie zestawione są w tab. 3.

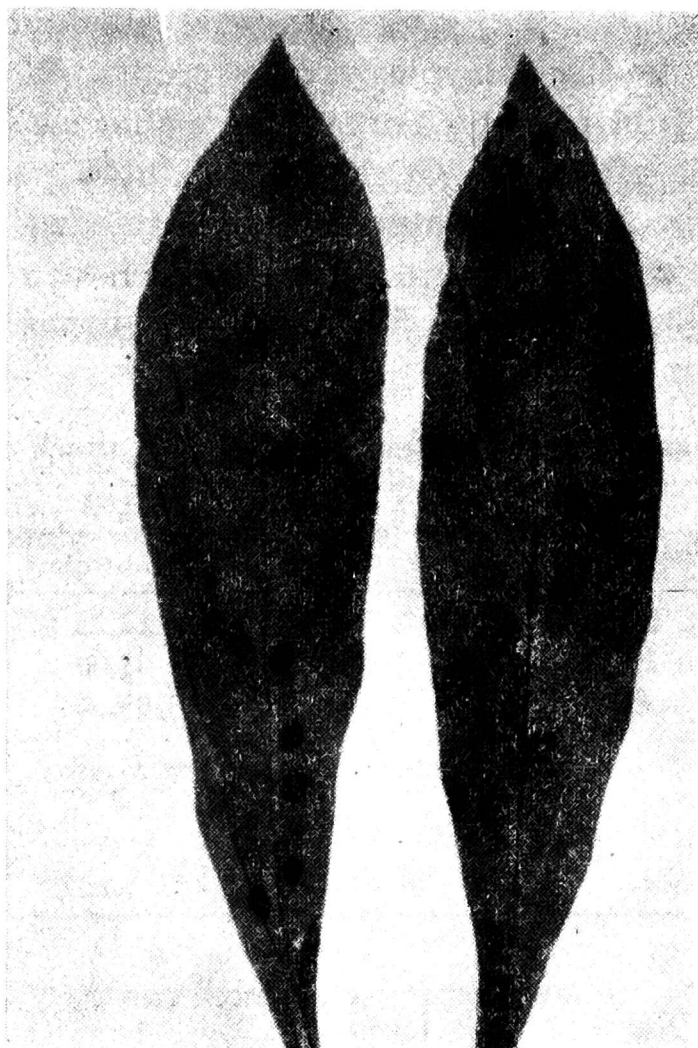
Tabela 3

Średnie liczby plam lokalnych na naprzeciwnych liściach trzeciego piętra *G. globosa* L.

Data	0,1% efedryna		% hamowania	0,01% efedryna		% hamowania
	kontrola	test		kontrola	test	
1965 r.						
15 VI	23,67	8,68	63,33	26,00	12,67	51,27
21 VI	18,33	5,67	69,07	11,33	7,00	38,22
1966 r.						
9 V	14,67	5,67	61,35	16,67	8,33	50,03
21 V	10,00	6,00	40,00	5,67	3,67	35,67
24 XI	7,67	4,67	39,11	7,67	5,33	30,50
Średni % hamowania			54,57			41,14
Średnia generalna:	kontrola — 19,00			test — 11,04		
Różnica	7,96					
Przedział ufności	5,89					
(P = 0,05)						

Rys. 1 przedstawia dwa naprzeciwnie liście *G. globosa*. Pierwszy (z lewej strony zdjęcia) zakażony został „sokiem wirusowym” z krążków trzymany na pożywce z dodatkiem 0,1% efedryny, drugi zaś sokiem





Rys. 1. *Gomphrena globosa* zakażona sokiem wirusowym. Na prawo liść kontrolny

kontrolnym. Analogicznie jak w wypadku poprzednim dwu roślin testowych i tu zaobserwowano istotny wpływ alkaloidu na powstawanie mniejszej liczby plamek w porównaniu z kontrolą. Średni procent hamowania namnażania się wirusa przy stężeniu 0,1‰ jest równy 54,57, a średnia różnica między obiektem testowym a kontrolnym — 8,73. Przy koncentracji efedryny 0,01‰ odpowiednio liczby te wynoszą 41,14 i 6,06. Wyliczenia statystyczne wykazały istotność tych różnic przy prawdopodobieństwie 0,95, z przedziałem ufności 5,89. W opisanych wyżej eksperymentach, podobnie jak w doświadczeniach z *C. amaranticolor*, nie stwierdzono statystycznej istotności różnic między wpływem obydwóch stężeń alkaloidu. Mimo to istnieje widoczna tendencja do większego ograniczenia infekcyjności soku przy wyższej koncentracji efedryny w pożywce. Zauważono to także w doświadczeniach z *C. amaranticolor* (tab. 2).

Zadano sobie wreszcie pytanie, czy na poszczególnych piętrach roślin testowych *G. globosa* wpływ alkaloidu na wirus zaznaczy się podobnie, czy też różnie. W tym celu przeprowadzono kilka doświadczeń zakażając nie tylko naprzeciwległe liście trzeciego, ale także pierwszego i drugiego piętra, licząc od nasady rośliny. Zastosowano tu stężenia efedryny 0,2‰ i 0,02‰. Wyniki zestawiono poniżej.

Jak wynika z obliczeń najslabiej wpłynął alkaloid na zahamowanie syntezy wirusowej w liściach pierwszego piętra. W liściach drugiego i trzeciego piętra średni procent hamowania wahał się ok. 50,0 przy obydwu koncentracjach efedryny. Oczywiście i tutaj potwierdził się fakt statystycznego udowodnienia istotności różnic między liczbą plamek na liściach zakażonych sokiem z krążków moczonych w roztworach efedryny a obiektem kontrolnym ( $P = 0,95$ , przedział ufności — 4,94).

Tabela 4

Średnie liczby plam lokalnych na naprzeciwległych liściach trzech pięter *G. globosa* L.

Piętro	0,2% efedryna		% hamowania	0,02% efedryna		% hamowania
	kontrola	test		kontrola	test	
I	16,00	14,00	20,41	12,25	10,25	16,33
II	29,25	12,75	56,41	21,00	12,25	41,66
III	20,00	9,75	51,25	15,50	7,50	51,61
Średnia generalna	kontrola — 19,00,		test — 11,09			
Różnica	7,91					
Przedział ufności ( $P = 0,05$ )	4,94					

## DOŚWIADCZENIA Z NIKOTYNA

Tabela 5 przedstawia średnie liczby plamek na połówkach szóstych liści *N. tabacum*, odm. White Burley, zakażonych sokiem infekcyjnym otrzymanym z krążków zanurzanych w pożywce z dodatkiem 0,04% nikotyny oraz bez nikotyny. Przeprowadzono 9 doświadczeń w styczniu, lutym, marcu i kwietniu 1967 r.

Tabela 5

Średnie liczby plam lokalnych na połówkach szóstych liści *N. tabacum* L. odm. White Burley

Data	0,04% nikotyna		% hamowania
	kontrola	test	
1967 r.			
17 I	66,75	23,50	64,79
18 II	20,08	12,60	37,25
27 II	15,80	8,40	46,84
21 III	10,20	3,20	70,00
21 III	6,40	3,80	40,62
30 III	50,00	31,75	36,50
30 III	39,50	28,50	27,85
17 IV	21,00	15,25	27,38
17 IV	18,00	13,75	23,61
Średnia generalna	27,53	15,64	41,65
Różnica	11,89		
Przedział ufności ( $P = 0,05$ )	4,45		

Średni procent hamowania namnażania się wirusa X pod wpływem 0,04% nikotyny, wynoszący 41,65, oraz średnia różnica między kontrolą a testem, wyrażająca się liczbą plamek 11,89 wskazują, że istnieje duża zależność pojawiania się infekcji lokalnych od działania alkaloidu. Prawdopodobieństwo istotności tej różnicy wynosi 0,95, przy przedziale ufności 4,45.

Wpływ nikotyny badano także na roślinach *C. amaranticolor* w maju i lipcu 1969 r. (tab. 6). Dwa doświadczenia nie pozwoliły niestety na wy-

Tabela 6

Średnie liczby plam lokalnych na połówkach liści *C. amaranticolor*

Data	0,01% nikotyna		%	0,04% nikotyna		%	0,2% nikotyna		%
	kon- trola	test		kon- trola	test		kon- trola	test	
1969 r.									
6 V	34,40	23,60	31,39	43,20	26,60	38,42	46,40	21,00	54,74
1 VII	61,50	47,75	22,36	35,25	28,50	19,15	72,25	43,00	40,48
Średni % hamowania			26,87	28,78			47,61		
Średnia generalna:			kontrola — 48,33,			test — 31,74			
Różnica			16,59						
Przedział ufności			6,49						
(P = 0,05)									

ciągnięcie autorytatywnych wniosków, tym niemniej opierając się na średnich spróbowano obliczyć statystycznie istotność różnic. Zastosowano trzy wzrastające stężenia nikotyny — 0,01, 0,04, i 0,2%. Stwierdzono po pierwsze, że procent hamowania powstawania plamek pod wpływem nikotyny był najwyższy przy najwyższej koncentracji tego alkaloidu i wynosił 47,61%. Przy stężeniach niższych wyrażał się liczbami 26,87 (0,01% nikotyny) i 28,78 (0,04% nikotyny). Generalnie obiekt kontrolny (bez alkaloidu) różnił się istotnie od testowego (z dodatkiem alkaloidu) przy prawdopodobieństwie 0,95 i przedziale ufności 6,49.

Naprzeciwległe liście umiejscowione na trzecim piętrze *G. globosa* badano w tym samym aspekcie co rośliny opisane powyżej. Doświadczenia przeprowadzono w różnych latach i różnych terminach, a w analizie zmienności średnie liczby plam z tych doświadczeń traktowano jako powtórzenia. Duża zmienność powtórzeń nie pozwoliła w tym wypadku udowodnić statystycznie hamowania infekcyjności „soku wirusowego” przez nikotynę. Zjawisko hamowania uwidoczniło się jednak, co widać w tabelach 7 i 8. Wyniki te potraktowano jednak tylko orientacyjnie, a badania nad wpływem nikotyny na powstawanie plam lokalnych na *G. globosa* uznano dopiero za wstępne.

Tabela 7

Średnie liczby plam lokalnych na naprzeciwnych liściach trzeciego piętra *G. globosa* L.

Data	0,01% nikotyna		% hamowania
	kontrola	test	
1967 r.			
14 XI	7,33	4,67	36,29
16 V	42,50	22,50	47,06
1 VII	11,00	10,00	9,09
6 X	3,00	2,00	33,00
Średnia generalna	15,96	9,79	31,36
Różnica	6,17		

Tabela 8

Średnie liczby plam lokalnych na naprzeciwnych liściach trzeciego piętra *G. globosa* L.

Data	0,04% nikotyna		% hamowania
	kontrola	test	
1966 r.			
31 X	13,67	7,33	46,38
14 XI	6,33	3,00	52,60
1969 r.			
1 VIII	12,50	11,50	8,00
6 X	10,00	8,50	15,00
Średnia generalna	10,62	7,58	30,49
Różnica	3,04		

## DYSKUSJA

W opisanych powyżej doświadczeniach zaznacza się hamujący wpływ alkaloidów — efedryny i nikotyny na infekcyjność soku z krążków wyciętych z liści *N. tabacum* L. zakażonych uprzednio ziemniaczanym wirusem X. Wyniki te zgodne są z danymi publikowanymi przez Bobyry [1], który stwierdził własności antywirusowe bardzo wielu alkaloidów. Prace tego typu prowadzono przeważnie z wirusem mozaiki tytoniowej. Nie spotkano natomiast w literaturze publikacji dotyczących działania alkaloidów na PVX.

W przypadku TMV z prac Schlegela i Rawlinsa [7] oraz Schneidera [8] nie można wysnuć ogólnego wniosku, że alkaloidy hamują namnażanie się tego wirusa, lub też je stymulują. Działanie tej licznej grupy związków, dzielących się na wiele typów w zależności od swej skomplikowanej budowy chemicznej, na aktywność patogena musi być bardzo różnorodne. Na pewno zależy ono jeszcze od koncentracji alkaloidu w pożywce, na co zwrócił uwagę Schneider [8] w swoich doświadczeniach z kofeiną i teofiliną.



W niniejszej pracy, mimo dość znacznej rozpiętości stężeń efedryny i nikotyny zależność ta nie ujawniła się wprawdzie zbyt wyraźnie, zaobserwowano jednak tendencję do większego ograniczenia infekcyjności „soku wirusowego” przy wyższej koncentracji alkaloidu (tab. 3, 4, 6).

Próba zbadania własności antywirusowych efedryny na różnych piętrach liści *G. globosa* L. wykazała słabsze hamowanie namnażania się wirusa X na liściach pierwszego piętra, zaś znacznie silniejsze (ok. 50,0%) na piętrach drugim i trzecim (licząc od podstawy rośliny).

Generalnie biorąc różnice między obiektami testowym (z dodatkiem alkaloidów) a kontrolnym (bez alkaloidów) udowodniono statystycznie przeważnie ze stopniem prawdopodobieństwa — 0,95, a nie 0,99. Wynika to z faktu, że powtórzeniami w analizie zmienności były średnie liczby infekcji lokalnych z poszczególnych doświadczeń, różniące się od siebie czasem bardzo znacznie. To z kolei było spowodowane różnymi terminami, w których prowadzono badania, a co za tym idzie niejednakowymi warunkami szklarniowymi. Tym samym zmienność powtórzeń była dość duża. Na tych samych roślinach testowych pojawiało się mniej lub więcej plam w zależności od miesiąca i roku, chociaż schemat doświadczeń był zawsze ten sam.

Różnica między testem a kontrolą uwidaczniała się jednak zawsze, chociaż w ramach poszczególnych powtórzeń (doświadczeń) procent hamowania namnażania się wirusa był niejednokrotnie różny.

*Pragnę wyrazić podziękowanie mgr inż. Ewie Dębowskiej za statystyczne opracowanie wyników.*

#### LITERATURA

1. Bobyr A. D.: The influence of alkaloids on the necrotic reaction caused by the TMV. Vop. Virus. 1959, z. 4, s. 363—366
2. Gubański M.: Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej ze sporyszu (*Claviceps purpurea*). Acta Soc. Bot. Pol. 1964, z. 4, s. 645—659
3. Gubański M.: Naturalne inhibitory wirusów roślinnych. Post. Mikrob. 1965, z. 3, s. 395—407
4. Kozłowska A.: Investigations on the strains of potato virus X in ultraviolet light. Bull. Acad. Pol. Sc. ser. B, 1950, s. 215—232
5. Robinson T.: The Biochemistry of Alkaloids. Berlin—Heidelberg—New York 1968
6. Salaman R. N.: The potato virus X, its strains and reactions. Phil. Trans. R. Soc., London 1938, t. 229, s. 137
7. 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
8. 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
9. Takahashi W. N., Rawlins T. E.: An electron microscope study of two strains of potato virus X. Am. J. Bot. 1946, t. 33, s. 740
10. Uteh M. N., Johnson J.: The inactivation of plant viruses by substances obtained from bacteria and fungi. Phytopath. 1950, t. 40, s. 247

*Мария Каменьска-Жила*

ВЛИЯНИЕ АЛКАЛОИДОВ — ЭФЕДРИНА И НИКОТИНА НА ИНФЕКЦИОННЫЕ  
СВОЙСТВА СОКА ИЗ ЛИСТЬЕВ ТАБАКА, ПОРАЖЕННЫХ X-ВИРУСОМ  
КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM VIRUS 1*, SMITH)

Резюме

В работе исследовано влияние двух алкалоидов — эфедрина и никотина на инфекционные свойства сока из листьев табака — *Nicotiana tabacum* L., зараженных X-вирусом картофеля. Установлено, что как эфедрин, так и никотин задерживают развитие X-вируса в среднем на около 40%. Опыты, проводимые при применении биологических методов, осуществлялись на нескольких тестовых растениях для X-вируса картофеля.

*Maria Kamińska-Żyła*

THE EFFECT OF ALKALOIDS — EPHEDRINE AND NICOTINE — ON INFECTIVE  
PROPERTIES OF THE SAP FROM TOBACCO LEAVES INFECTED BY POTATO  
VIRUS X (*SOLANUM VIRUS 1*, SMITH)

Summary

The paper discusses the influence of the two alkaloids — ephedrine and nicotine upon infective properties of the sap from leaves of tobacco — *Nicotiana tabacum* L., infected by potato virus X. It was found that both ephedrine and nicotine inhibit the development of virus X on average by circa 40%. Experiments were carried out with the use of biological methods on several test plants for the potato virus X.