

## WPŁYW METABOLITÓW GRZYBÓW I INNYCH SUBSTANCJI NA INFEKCYJNOŚĆ WIRUSÓW *NICOTIANA VIRUS 1* SMITH I *SOLANUM VIRUS 1* (ORTON) SMITH

Władysław Błaszczak, Zbigniew Weber, Wanda Macior

Instytut Ochrony Roślin, AR Poznań

Substancje różnego pochodzenia i o różnej naturze (związki nisko- lub wysokocząsteczkowe) hamujące infekcyjność lub reprodukcję wirusów nazywane są inhibitorami. Obecność inhibitorów w sokach roślin wyższych po raz pierwszy stwierdzili Duggar i Armstrong w 1925 r. [5]. W następnych latach wykazano również obecność inhibitorów u grzybów [10, 11, 12], promieniowców [15], porostów [14] i w innych organizmach świata roślin. Inhibitory stwierdzono także i u zwierząt [1, 9] oraz w produktach pochodzenia zwierzęcego np. w mleku [6].

W pracy niniejszej badano wpływ metabolitów:

— 30 gatunków grzybów, soków 5 gatunków roślin nasiennych, uracylu i kwasu borowego na infekcyjność wirusów: *Nicotiana virus 1* (TMV) i *Solanum virus 1* (PVX),

— 3 gatunków grzybów, w zależności od wieku kultur, z których je pozyskano, na infekcyjność TMV i PVX,

— 6 gatunków grzybów na namnażanie się TMV.

Zamierzone cele osiągnięto w trzech doświadczeniach.

### MATERIAŁ I METODYKA

Wirusy TMV i PVX utrzymywano i namnażano na *Nicotiana tabacum* L. var. Turecki. Roślinami testowymi, użytymi do określania wpływu zastosowanych w pracy substancji, były: dla TMV — *Nicotiana glutinosa* L., a dla PVX — *Gomphrena globosa* L. Wirusy pochodziły z kolekcji Instytutu Ochrony Roślin — Zespołu Dydaktycznego Fitopatologii. Większość gatunków grzybów otrzymano z Instytutu Ochrony Lasu, Zespołu Dydaktycznego Fitopatologii Leśnej, Akademii Rolniczej w Poznaniu.

Stosowane w doświadczeniach (1 i 2) metabolity grzybów stanowiła płynna pożywka glukozowo-ziemniaczana, na której rosły poszczególne gatunki grzybów. W skład tej pożywki wchodziły: 20 g glukozy, 500 ml wywaru z 200 g ziemniaków oraz H<sub>2</sub>O dest. (do 1000 ml). Wiek kultur grzybów, z których pochodziły metabolity wynosił w pierwszym doświadczeniu 21 dni, a w drugim 3, 8, 13 i 23 dni. Stosowane soki bada-

nych gatunków roślin uzyskano poprzez ich roztarcie w moździerz i odsączenie przez gazę opatrunkową. Związki chemiczne (uracyl i kwas borowy) użyto w stężeniu 1,5 procent. Wymienione trzy grupy substancji używano do rozcieńczania soków z roślin zakażonych przez wirusy (przechowywanych w lodówce o temp. 4°C): TMV — 1 : 500, a PVX — 1 : 10.

Tak przygotowanymi sokami inokulowano połówki liści *N. glutinosa* (TMV), bądź jeden liść z każdej pary liści *G. globosa* (PVX). Przeciwnie połówki lub całe liście traktowano jako kontrolne i inokulowano je sokiem z roślin chorych, rozcieńczonym wodą destylowaną.

Badanie wpływu inhibitorów na namnażanie się TMV przeprowadzono z sześcioma, najbardziej efektywnymi metabolitami grzybów. Ze świeżo inokulowanych liści *N. tabacum* wirusem TMV wycinano krążki o średnicy 1,8 cm i układano je inokulowaną stroną do metabolitów otrzymanych z kultur 21 dniowych. Po upływie 2, 4, 6, 8 i 10 dni wyjmowano po 10 krążków, opłukiwano je w wodzie wodociągowej, osuszano i rozcierano w moździerz. Do otrzymanego soku dodawano 0,25 ml wody. Uzyskanym w ten sposób inokulum zakażono połówki liści *N. glutinosa*. Przeciwnie połówki liści inokulowano sokiem uzyskanym z „krążków” utrzymywanych w wodzie.

We wszystkich doświadczeniach zakażanie roślin wykonywano poprzez pocieranie liści opylonych uprzednio karborundowym proszkiem zwilżonymi w inokulum tamponikami z gazy. Rośliny, zarówno przed jak i po inokulacji, trzymano w szklarni, w której temperatura wahała się od 15,2 do 20,6°C. Ziemia i wazonny używane w doświadczeniach były dezynfekowane przez dwugodzinne parowanie.

Ocenę wpływu badanych substancji na infekcyjność lub namnażanie się wirusów wykonano na podstawie liczb plam lokalnych na roślinach testowych. Obniżenie infekcyjności wirusów obliczono zgodnie ze wzorem:

$$W = \frac{(P_k - P_i) 100}{P_k} \%$$

gdzie:

$W$  — obniżenie infekcyjności w procentach,

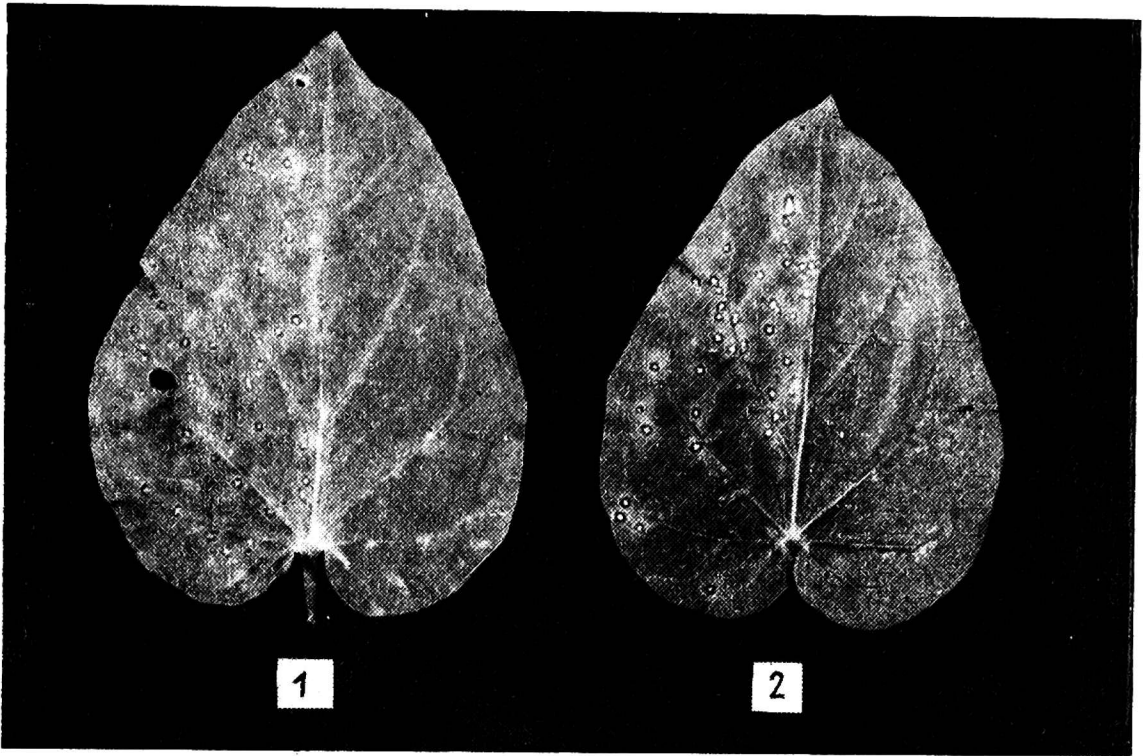
$P_k$  — liczba plam na połówkach lub całych liściach kontrolnych,

$P_i$  — liczba plam na połówkach lub całych liściach zakażonych inokulum traktowanym badanymi substancjami.

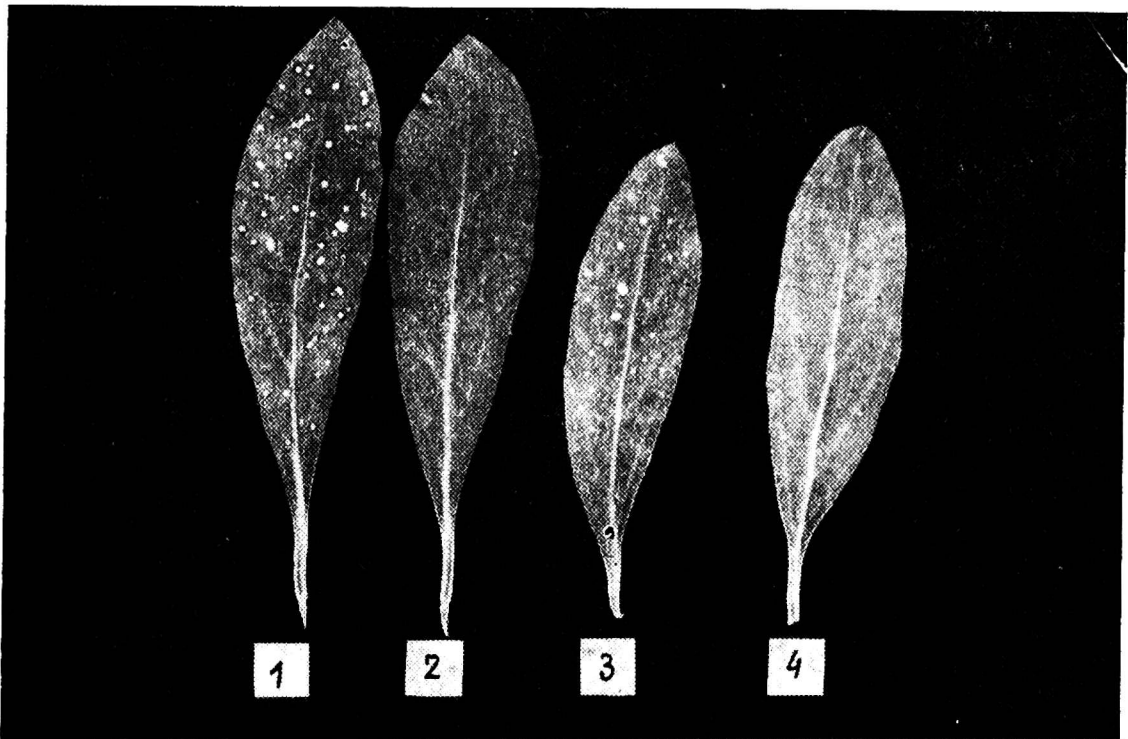
## WYNIKI

### WPLYW METABOLITÓW GRZYBÓW, SOKÓW ROŚLIN, URACYLU I KWASU BOROWEGO NA INFEKCYJNOŚĆ TMV I PVX

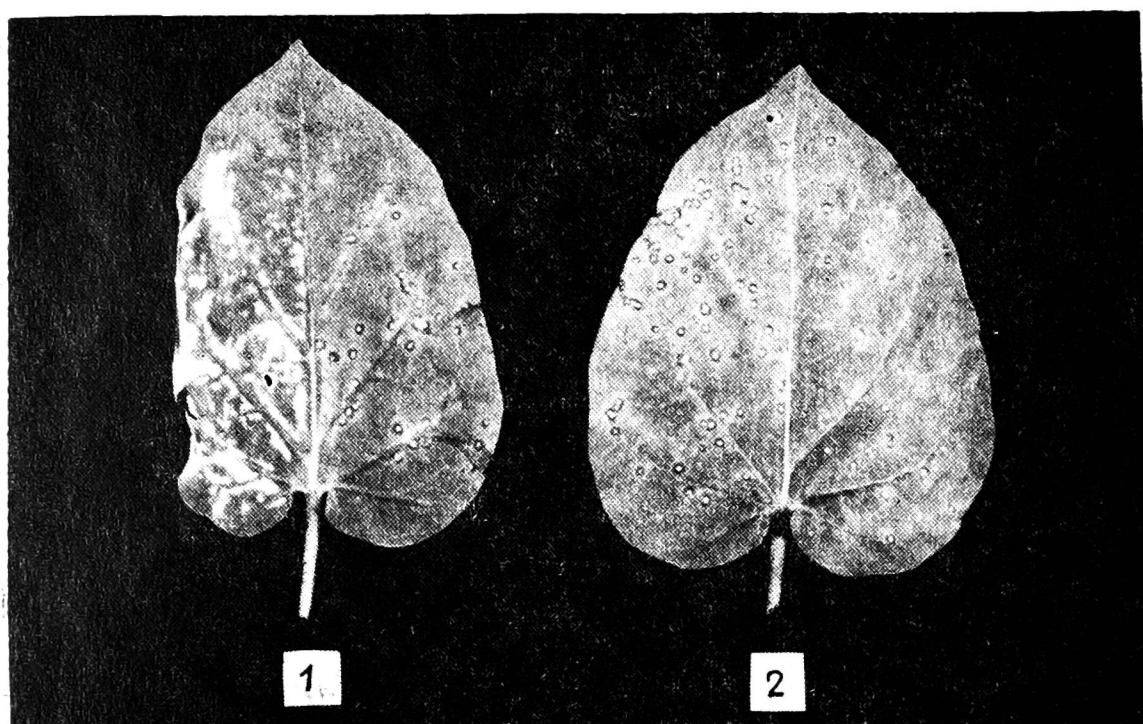
Infekcyjność TMV całkowicie ograniczyły metabolity dwóch grzybów: *Penicillium chrysogenum* i *Verticillium candelabrum* oraz soki dwóch gatunków roślin: *Chenopodium amaranticolor* i *Pelargonium* sp.



Rys. 1. Całkowite ograniczenie infekcyjności TMV na prawych połówkach liści *Nicotiana glutinosa* (lewe połówki kontrolne)  
 1 — przez metabolit *Penicillium waksmani*, 2 — przez sok z *Pelargonium sp.*



Rys. 2. Ograniczenie infekcyjności PVX na liściach *Gomphrena globosa*  
 1, 3 — kontrola, 2 — sok *Chenopodium amaranticolor*, 4 — sok *Apium graveolens* odm. rapaceum



Rys. 3. 1 — Całkowite ograniczenie infekcyjności TMV na lewej połówce liścia *Nicotiana glutinosa* i uszkodzenie jej przez metabolit *Verticillium candelabrum* (połówka prawa — kontrola) 2 — Częściowe ograniczenie infekcyjności TMV na prawej połówce liścia przez sok *Armoracia lapathiofolia* (połówka lewa — kontrola)



Rys. 4. Liście *Gomphrena globosa* inokulowane PVX.  
1 — kontrola, 2 — z zastosowaniem metabolitu *Verticillium candelabrum*



(tab. 1). Metabolity wszystkich innych gatunków grzybów obniżyły infekcyjność TMV również w wysokim stopniu, w granicach 92,1 do 99,9% (rys. 1). Także soki badanych gatunków roślin bardzo skutecznie ograniczyły infekcyjność TMV (rys. 1). Stosunkowo najniższe ograniczenie infekcyjności wywołał sok *Armoracia lapathifolia* — 83,1 procent. Wyją-

Tabela 1

Wpływ metabolitów 21-dniowych kultur grzybów i innych substancji na infekcyjność TMV i PVX

Metabolity grzybów i inne substancje	Obniżenie infekcyjności	
	TMV	PVX
<i>Ophiobolus graminis</i> Sacc.	97,6	58,5
<i>Lycoperdon perlatum</i> Pers.	98,3	60,0*
<i>Poria vaporaria</i> Pers.	99,7	71,7
<i>Polisticus versicolor</i> (Fr) Pilat	99,3	39,0
<i>Laccoria laccata</i> (Scop. ex Fr.) Bk. et Br.	96,8	57,0*
<i>Omphalia hydrogramma</i> Fr. Syst. M. J.	99,9	81,0
<i>Naematoloma capnoides</i> (Fr.) P. Karst.	99,7	66,0*
<i>Naematoloma fasciculare</i> (Huds et Fr.) P. Karst.	99,6	76,5
<i>Phoma betae</i> (Qud) Frank	98,1	32,9
<i>Pestalozzia hartigii</i> Tub.	98,6	10,0
<i>Coniothyrium fuckeli</i> Sacc.	98,3	54,0*
<i>Trichothecium roseum</i> Link.	97,4	41,0
<i>Trichoderma varidae</i> Person ex Fries	99,5	91,8*
<i>Trichoderma koningi</i> Qud.	97,4	28,7
<i>Trichoderma lignorum</i> (Tode) Harz.	99,2	26,2
<i>Penicillium waksmani</i> Zaleski	99,9	23,3*
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	100,0	24,7
<i>Penicillium decumbens</i> Thom	99,6	51,1
<i>Penicillium velutinum</i> van Beyma	99,9	28,6
<i>Penicillium terlikowski</i> Zaleski	99,7	59,3
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	99,6	—
<i>Botrytis cinerea</i> Persoon	98,7	50,0*
<i>Verticillium cellulosae</i> Daszewska	99,9	—
<i>Verticillium candelabrum</i> Bonorden	100,0	95,2*
<i>Alternaria radicina</i> Meier, Drechster	93,8	9,0
<i>Fusarium bulbigenum</i> Cooke and Masee	99,1	71,7*
<i>Fusarium angustum</i> Sherbakoff	93,4	40,0
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl	92,1	88,9
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn — izol. 7	94,0	17,0
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn — izol. 21	93,8	+19,0
<i>Chenopodium amaranticolor</i> L.	100,0	100,0*
<i>Fragaria</i> sp.	99,7	100,0*
<i>Armoracia lapathifolia</i> Gilib.	83,1	98,8
<i>Apium graveolens</i> L. var. rapaceum	85,3	100,0*
<i>Pelargonium</i> sp.	100,0	99,4
Uracyl	+94,9	+10,4
Kwas borowy	+12,0	52,2

+ — zwiększenie infekcyjności wirusa.

\* — istotne obniżenie infekcyjności.

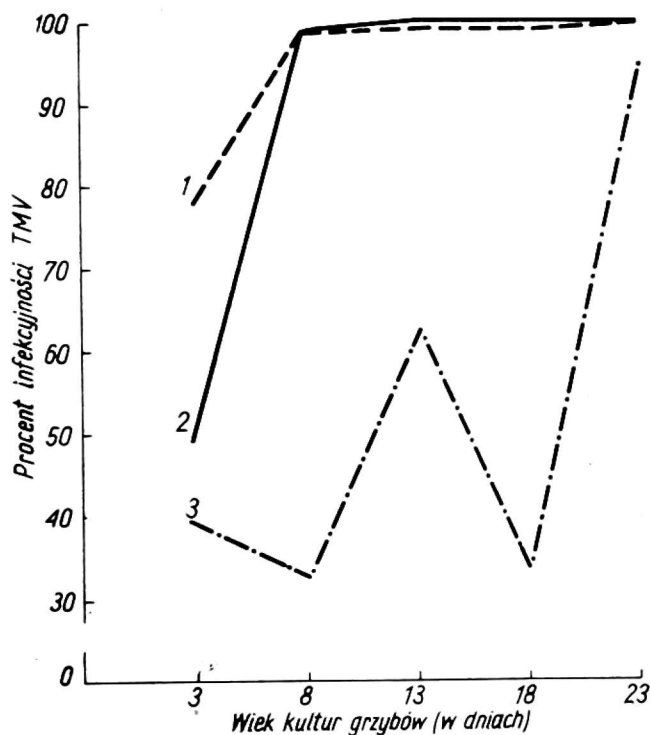
tek stanowiły uracyl i kwas borowy, które zwiększyły infekcyjność TMV odpowiednio o 94,9% i 12,0 procent.

Infekcyjność PVX ograniczyły całkowicie tylko soki: *Fragaria* sp., *Apium graveolens* (rapaceum), *Chenopodium amaranticolor* (rys. 2). Najniższe ograniczenie infekcyjności wywołał metabolit grzyba *Penicillium waksmani* (23,3%), a nieznaczne zwiększenie infekcyjności wywołały: uracyl (10,4%) i metabolit *Rhizoctonia solani* — izolat 21 (19,0%).

Metabolit grzyba *Verticillium candelabrum* powodował znaczne uszkodzenie inokulowanych liści roślin testowych (rys. 3 i 4).

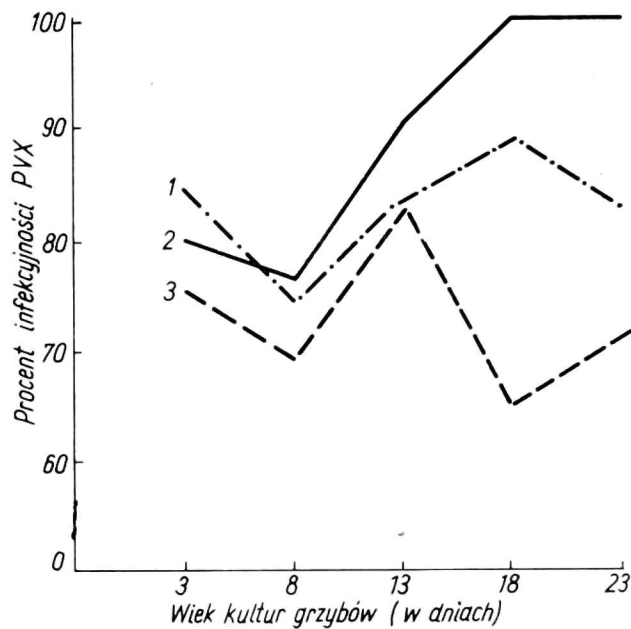
#### WPLYW CZASU HODOWLI GRZYBÓW NA ZDOLNOŚĆ OGRANICZANIA PRZEZ ICH METABOLITY INFEKCYJNOŚCI TMV i PVX

Metabolity *Fusarium angustum* i *Penicillium chrysogenum* pobrane z kultur 8 dniowych wykazały duże działanie ograniczające infekcyjność TMV. Wzrost inhibującego działania metabolitów wystąpił najsilniej między 3 a 8 dniem hodowli grzybów z wyjątkiem *Laccaria laccata* (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ wieku metabolitów na infekcyjność TMV w stosunku do *Nicotiana glutinosa*  
1 — *Fusarium angustum*, 2 — *Laccaria laccata*, 3 — *Penicillium chrysogenum*

Stopniowy wzrost właściwości ograniczających infekcyjność PVX wystąpił wraz ze zwiększaniem się wieku kultur grzyba u *V. candelabrum*. Metabolity tego grzyba z kultur 18 i 23 dniowych całkowicie zapobiegały infekcji (rys. 6). Mniej równomierne i prawie zawsze słabsze



Rys. 6. Wpływ wieku metabolitów na infekcyjność PVX w stosunku do *Gomphrena globosa*  
 1 — *Botrytis cinerea*, 2 — *Verticillium candelabrum*, 3 — *Pestalozzia hartigii*

ograniczenie infekcyjności PVX powodowały metabolity dwóch pozostałych gatunków grzybów.

#### WPLÝW METABOLITÓW GRZYBÓW NA NAMNAŻANIE SIĘ TMV

Prawie całkowite zahamowanie namnażania się wirusa TMV (93,5-100%) w krążkach liści tytoniu spowodowały metabolity dwóch gatunków grzybów *V. candelabrum* i *Omphalia hydrogramama* (tab. 2). Metabolity pozostałych 4 gatunków grzybów silnie hamowały namnażanie się TMV (49,8-82,0%) tylko w krążkach utrzymywanych w nich przez 2 i 4 dni. Następnie ich hamujące działanie stopniowo malało aż do całkowitego zaniku, a nawet stwierdzono nieznaczne zwiększenie się koncentracji TMV w krążkach utrzymywanych w metabolitach *Penicillium velutinum*.

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Wpływ metabolitów grzybów, soków roślin, uracylu i kwasu borowego na infekcyjność wirusów TMV i PVX był zróżnicowany. Metabolity badanych grzybów silniej ograniczały infekcyjność TMV niż PVX. Grela i współautorzy [8] donoszą również o silniejszym ograniczaniu infekcyjności TMV niż PVX przez pochodne alfatrójhalagenoamin. Crowley wykazał, że ograniczające działanie wyciągu z zarodków ogórka zależało od rośliny gospodarza użytej do oznaczania infekcyjności [4]. Gendron i Kassanis stwierdzają, że zakres działania inhibitorów zależy od gatunku inokulowanej rośliny a nie od wirusa [7]. Jedynie metaboli-

Tabela 2

Wpływ czasu utrzymywania krążków liści *Nicotiana tabacum* (Turecki) w metabolitach grzybów na namnażanie się TMV  
 Czas utrzymywania krążków liści w metabolitach (dni)

Gatunek grzyba	2		4		6		8		10	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
<i>Verticillium candelabrum</i>	4,1	98,6	6,1	93,5	56,2	99,95	110,2	98,0	69,6	99,2
<i>Omphalia hydrogramma</i>	7,1	97,2	18,7	99,0	55,3	100,0	90,1	100,0	90,4	99,3
<i>Poria vaporaria</i>	4,8	74,9	60,7	59,0	50,5	35,0	167,7	76,0	74,3	53,0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	7,2	81,0	79,4	79,0	82,1	60,7	80,2	15,0	69,7	17,0
<i>Penicillium waksmani</i>	10,2	66,0	25,2	82,2	59,7	44,0	101,5	32,0	92,9	19,0
<i>Penicillium velutinum</i>	6,5	60,0	110,8	49,8	68,2	41,1	43,8	10,0	101,9	2,1
Przeciętnie			79,6		77,1		63,5	51,8		47,6

a — Liczba plam na kombinacji kontrolnej.

b — Procent obniżenia namnażania.



ty *Trichoderma viridae* i *V. candelabrum* w bardzo wysokim stopniu ograniczyły infekcyjność obydwu wirusów (91,8-100%). Gupta i Price [11] donoszą o ograniczaniu infekcyjności trzech badanych wirusów przez filtraty tylko czterech spośród 49 badanych gatunków grzybów, a jednego z trzech wirusów przez filtraty 36 gatunków grzybów.

Soki wszystkich badanych gatunków roślin ograniczały infekcyjność wirusów w wysokim stopniu (TMV od 83,1 do 100%; PVX od 98,8 do 100%). Całkowite ograniczenie infekcyjności PVX przez soki *Pelargonium hortorum*, *Chenopodium album*, *Ch. amaranticolor* i 2 odmian *Cap-sicum frutescens* wykazali Błaszczak i współautorzy [2]. Pełne ograniczenie infekcyjności TMV powodowały też soki *Pelargonium zonale*, *Campanula boniensis* i *Dianthus caryophyllus*, a w 80% sok *Armoracia lapathifolia* [3].

Kwas borowy zastosowany w stężeniu 1,5% nie wpłynął w decydujący sposób na infekcyjność TMV i PVX. Uracyl stymulował łagodnie infekcyjność wirusów. Lindner i współautorzy [13] również nie stwierdzili hamującego działania uracylu na infekcyjność TMV.

Metabolity pochodzące z trzydniowej hodowli grzybów częściowo ograniczały już infekcyjność badanych wirusów. Działanie to zwiększało się wraz ze zwiększaniem się wieku grzybów, od których pochodziły metabolity. Wyjątek stanowiły metabolity *Botrytis cinerea* i *Pestalozzia hartigii*. Ograniczały one infekcyjność PVX w podobnym stopniu, niezależnie od wieku kultur, z których je pobrano. Można przypuszczać, że wytwarzanie substancji inhibujących przez poszczególne gatunki grzybów przebiega z różną szybkością.

Działanie metabolitów grzybów na namnażanie się TMV było zróżnicowane. Metabolity *V. candelabrum* i *Omphalia hydrogramma* ograniczały bardzo znacznie namnażanie się TMV przez cały czas trwania doświadczenia (2-10 dni). Metabolity pozostałych grzybów najsilniej hamowały namnażanie się TMV w krążkach liści *N. tabacum* (Turecki) utrzymywanych przez 2 i 4 dni, a później działanie ich słabło.

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Metabolity wszystkich badanych gatunków grzybów zawierały substancje w wysokim stopniu ograniczające infekcyjność TMV na tytoniu lepkiem. Działanie ograniczające tych metabolitów na infekcyjność PVX było znacznie słabsze, silnie zróżnicowane u badanych gatunków i w wielu przypadkach nieistotne. Oznacza to, że inhibujące działanie metabolitów grzybów na infekcyjność wirusów zależy głównie od układu roślina — wirus.

2. W sokach badanych gatunków roślin (komosa, poziomka, chrzan, seler, pelargonia) stwierdzono występowanie substancji w wysokim stopniu (do 100%) obniżające infekcyjność TMV i PVX. Substancje te ograniczają możliwość przenoszenia wirusów z rośliny na roślinę (z ga-

tunku na gatunek) na drodze mechanicznej. Stanowiąc to może naturalną zaporę szerzenia się wirusów w przyrodzie.

3. Najwyższe wskaźniki obniżenia infekcyjności TMV i PVX dawały metabolity z 8-18 dniowych kultur grzybów.

4. Utrzymywanie krążków liści *N. tabacum* Turecki zainokulowanych TMV w metabolitach 3 tygodniowych kultur grzybów hamowało namnażanie się wirusa. Hamowanie to było bardzo silne przez cały czas utrzymywania (2-10 dni) krążków liści w metabolitach *Verticillium candelabrum* i *Omphalia hydrogramma*. Działanie metabolitów pozostałych gatunków grzybów było słabsze i stopniowo malało.

*Autorzy dziękują prof. dr K. Mańce za przekazane kultury grzybów.*

#### LITERATURA

1. Black L. M.: Inhibition of virus activity by insect juices. *Phytopath.* 1939, 29 s. 321-337
2. Błaszczak W., Ross F. A., Larson R. H.: The inhibitory activity of plant juices on the infectivity of potato virus X. *Phytopath.* 1959, 49 s. 784-791
3. Błaszczak W., Fiedorow Z.: Wpływ niektórych inhibitorów na infekcyjność wirusa mozaiki tytoniu. *Rocz. Nauk rol. ser. A*, 1969, 95 s. 417-426
4. Crowley N. C.: The effect of seeds extracts on the infectivity of plant viruses and its bearing on seed transmission. *Aust. J. biol. Sci.* 1955, 8 s. 56-57
5. Duggar B. M., Armstrong J. K.: The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1925, 4. s. 359-366. *Wg Rev. Appl. Myc.* 1926, 5 s. 377
6. Fulton R. W.: The sensitivity of plant viruses to certain inactivators. *Phytopath.* 1943, 33 s. 674-682
7. Gendron Y., Kassanis B.: The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors. *Ann. appl. Biol.* 1954, 41 s. 183-188
8. Grela T., Hoppe W., Jakuszowa A.: Z badań nad wirostatycznym działaniem niektórych pochodnych alfatrójhalogenoamin. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.* 1969, 94, s. 135-139
9. Gubański M.: Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej z kosarzy (*Phalanzum opilio* L.). *Acta Soc. Bot. Pol.* 1963, 32, s. 427-433
10. Gubański M.: Inhibitor wirusa mozaiki tytoniowej ze sporyszu. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1964, 33 s. 645-659
11. Gubański M., Saniewski M.: Próby izolowania inhibitora z niektórych gatunków purchawek (*Lycoperdon*). *Acta Soc. Bot. Pol.* 1967, 36 s. 441-448
12. Gupta B. M., Price W. C.: Production of plant virus inhibitors by fungi. *Phytopath.* 1950, 40 s. 642-652
13. Lindner R. C., Hugh C., Kirkpatrick T., Weeks E.: Comparative inhibition of virus multiplication by certain types of chemicals. *Phytopath.* 1959, 49, s. 802-807
14. Moycho W., Gubański M.: Wyciąg z porostu *Cetraria islandica* inhibitorem WMT. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1959, 28 s. 158-196
15. Ucholina R. S.: Ob inaktiwirujuszczem deistwii aktinomicetow na wirus tabacznój mozaiki. *Mikrobiologia* 1958, 27, s. 352-356

Владислав Блащак, Збигнев Вебер, Ванда Мацёр

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБОВ И ДРУГИХ ВЕЩЕСТВ  
НА ИНФЕКЦИОННОСТЬ *NICOTIANA VIRUS 1* SMITH  
И *SOLANUM VIRUS 1* (ORTON) SMITH

Резюме

В лабораторно-тепличных исследованиях установлено, что метаболиты 30 видов грибов в высокой степени ограничивали инфекционность TMV на *Nicotiana glutinosa* и несколько слабее инфекционность PVX на *Gomphrena globosa*. Метаболит *Verticillium candelabrum* кроме того показал сильное фитотоксическое действие в отношении *N. glutinosa* и *G. globosa*. Тормозящее действие метаболитов зависело от возраста культур, из которых они отбирались. Содержание кружков листьев *N. glutinosa*, инокулированных TMV в метаболитах грибов ограничивало размножение вируса, причем это действие постепенно уменьшалось. Также соки 5 исследуемых видов растений (*Chenopodium*, *Fragaria*, *Apium*, *Pelargonium*, *Armoracia*) в высокой степени ограничивали инфекционность TMV и PVX.

Władysław Błaszczak, Zbigniew Weber, Wanda Macior

INFLUENCE OF FUNGAL METABOLITES AND OTHER SUBSTANCES ON  
THE INFECTIVITY OF *NICOTIANA VIRUS 1* SMITH AND *SOLANUM VIRUS 1*  
(ORTON) SMITH

Summary

It was proved in laboratory and greenhouse experiments that the metabolites of 30 species of fungi inhibited in high degree the infectivity of TMV on *Nicotiana glutinosa* and in smaller degree the infectivity of PVX on *Gomphrena globosa*. More over the metabolite of *Verticillium candelabrum* appeared to be severely phytotoxic to *N. glutinosa* and *G. globosa*. The inhibitory activity of metabolites depended on the age of fungicultures. The maintenance of leaf-disks of *N. glutinosa* inoculated with TMV in the metabolites of fungi limited the virus replication but the action of metabolites gradually decreased. Also the saps of five tested plant species (*Chenopodium*, *Fragaria*, *Apium*, *Pelargonium*, *Armoracia*) strongly inhibited the infectivity of TMV and PVX.