

## WPŁYW SKOPOLETYNY NA INFEKCYJNOŚĆ WIRUSA MOZAIKI TYTONIU W ROŚLINACH TYTONIU

*Antonina Mikulska-Macheta*

Instytut Przyrodniczych Podstaw Produkcji Roślinnej AR, Kraków

Reakcja rośliny na zakażenie, określana jako obronność lub odporność, nie została ostatecznie wyjaśniona. Mechanizmy różnych rodzajów odporności u roślin zarówno wrodzonej, jak i nabytej, polegają na wytworzeniu substancji czynnych [12, 13], działających wiostatycznie, inaktywujących wirusy lub działających wirusobójczo.

Najosobliwszą grupę pod tym względem stanowią związki endogeniczne, czynne w metabolizmie, działające jako naturalne inhibitory [15, 17]. Mają one szczególny charakter, mimo różnych własności chemicznych. Ich cechą wspólną jest specyficzność w stosunku do organizmów fitopatogennych, co odróżnia je od ciał odpornościowych [5, 6, 11, 14, 16]. Następstwem infekcji jest powstawanie substancji normalnie nie spotykanych w tkankach roślinnych, w tym również inhibitorów [10]. Pojawiają się one w większej ilości u wielu gatunków roślin wyższych w stanach patologicznych wywołanych nie tylko infekcją, ale również niedoborem składników pokarmowych, jak i urazami mechanicznymi [4, 9, 11]. Do takich związków należy skopoletyna, która podobnie jak kumaryna jest pochodną kwasu cynamonowego. Skopoletyna jest najbardziej charakterystycznym związkiem kumarynowym w takich roślinach jak ziemniak i tytoń [3, 4].

Celem podjętej pracy było wykazanie reakcji roślin tytoniu zdrowych, u których skopoletyna nie występuje jako metabolit [18], i poddanych infekcji wirusem, na wprowadzoną sztucznie do organizmu skopoletynę. Określony został również wpływ tego związku na infekcyjność wirusa mozaiki tytoniu w roślinie oraz *in vitro*.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono z siewkami tytoniu *Nicotiana glutinosa*. Rośliny uprawiano w warunkach szklarniowych, w termicznie odkażonej ziemi ogrodowej. W okresie prowadzonych obserwacji temperatura w szklarni wahała się w granicach 18-22°C, a wilgotność względna wynosiła średnio 75%. W okresie zimowym rośliny doświetlano sztucznie przez około 10 godzin w ciągu doby. W celu określenia wpływu skopoletyny roślinom kontrolnym aplikowano wodę destylowaną i pożywkę płynną dla tytoniu (pH 6,8), roślinom testowanym pożywkę z dodatkiem 100 mg skopoletyny na 1 l pożywki. Szczegółowo określono zwiększenie liczby liści na roślinach, przyrost powierzchni blaszek liściowych i rozwój systemu korzeniowego. Rośliny w stadium 7-10 liści (nie biorąc pod uwagę dwóch pierwszych liści ze względu na zbyt małe rozmiary) opylano karborundem o gradacji 500 mesh i infekowano mechanicznie. Inokulat stanowił wirus mozaiki tytoniu oczyszczony wg metody Knighta [8], a następnie rozcieńczony buforem fosforanowym (pH 7,2). Po wystąpieniu symptomów zakażenia określono infekcyjność wirusa na podstawie ilości nekroz, które pojawiły się na roślinach kontrolnych i poddanych działaniu skopoletyny.

Aby uściślić warunki uprawy siewek tytoniu i możliwość ścisłego dozowania składników podłoża zastosowano również kultury wodne. Badając wpływ skopoletyny na podatność siewek tytoniu lepkiego na wirus mozaiki tytoniu, stosowano metodę połówek liściowych i zróżnicowane okresy inkubacji. Pobierano wyłącznie czwarty i piąty liść z roślin o wyrównanym rozwoju, eliminując zmienność osobniczą, by tym skuteczniej określić wpływ badanego związku na rozwój infekcji u tytoniu. Poddając wirus mozaiki tytoniu działaniu skopoletyny, stosowano ją w postaci par, prowadząc inkubację przez okres od 24 do 72 godzin, w temperaturze 26°C. Następnie preparat wirusa rozcieńczono buforem fosforanowym do odpowiedniego stężenia. Testy biologiczne przeprowadzono używając w jednym powtórzeniu co najmniej 10 połówek liści tytoniu *Nicotiana glutinosa*. Liczba pojawiających się brunatnych nekroz służyła za podstawę obliczania względnego spadku infekcyjności pod wpływem skopoletyny.

W celu określenia przyrostu świeżej masy tkanek pochodzących z liści, zastosowano metodę krążków [2, 7]. Porównano przyrost na podłożach, które stanowiły: woda z dodatkiem 0,3 g/l sulfanilamidu, pożywka sacharozowa o składzie 20 g sacharozy, 0,2 g  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i 0,3 g sulfanilamidu (pabiamidu) w 1 litrze wody oraz pożywka sacharozowa z dodatkiem zróżnicowanych dawek skopoletyny. Krążki liściowe pochodzące z roślin zdrowych i infekowanych wirusem, zamknięte w szalkach Petry'ego, przechowywano w komorze wegetacyjnej, w warunkach stałego oświetlenia typu „Flora”, w temperaturze  $\pm 26^\circ\text{C}$ . Jest to temperatura sprzyjająca aktywności związków kumarynowych. Po upływie 72

godzin takiej inkubacji, krążki płukano, osuszano na bibule filtracyjnej i ważono. Przeliczono liczbę nekroz na 1 cm<sup>2</sup> powierzchni liścia. Procent zahamowania infekcyjności obliczono wg Utecha i Johnsona [19].

## WYNIKI

U roślin tytoniu uprawianych w warunkach szklarniowych w ziemi ogrodowej, stwierdzono znaczne różnice w rozwoju wegetacyjnym. Uzyskane wyniki (tab. 1) wykazują, że skopoletyna wprowadzona do orga-

Tabela 1

Rozwój siewek tytoniu *Nicotiana glutinosa* uprawianych w ziemi ogrodowej traktowanych roztworami wodnymi

Rozwój roślin w badanym okresie (średnie)	Rodzaj roztworu wodnego		
	woda destylowana	pożywka dla tytoniu pH=6,8	pożywka pH=6,8, skopoletyna 100 mg/l
Liczba liści na roślinie			
na początku doświadczenia	10,8	10,2	10,2
na końcu doświadczenia	11,6	13,4	14,4
Przyrost liści na jednej roślinie	0,8	3,2	4,2
Powierzchnia liści	173,6	180,3	161,8
Liczba nekroz na 1 cm <sup>2</sup> powierzchni liścia	4,6	8,9	5,8
Długość systemu korzeniowego	162,4	238,5	177,2

nizmu rośliny poprzez system korzeniowy, wpłynęła stymulująco na rozwój liczby liści. Równocześnie stwierdzono hamujący jej wpływ na rozwój powierzchni blaszek liściowych i rozmiary systemu korzeniowego młodych siewek. Rośliny traktowane wyłącznie wodą destylowaną w okresie doświadczenia, stanowiące kontrolę wskutek potęgującego się niedoboru składników mineralnych, rozwijały się słabiej w porównaniu z roślinami, które hodowano na pożywkach. Stąd też przy zastosowaniu jednakowej koncentracji wirusa, podczas infekcji tytoniu, rośliny uległy porażeniu patogenem w różnym nasileniu. Fakt ten znalazł odzwierciedlenie w liczbie nekroz przypadających na jednostkę powierzchni liści. Ponadto stwierdzono zahamowanie infekcyjności pod wpływem skopoletyny w 35,5<sup>0</sup>%. Zatem skopoletyna podana roślinom w ilości 100 mg na jeden litr pożywki, okazała się wydajnym inhibitorem infekcji wirusowej.

Zainfekowane wirusem mozaiki tytoniu siewki tytoniu *Nicotiana glutinosa*, uprawiane w kulturach wodnych, zareagowały na zaaplikowaną skopoletynę również zahamowaniem infekcyjności. Jak wynika z tabeli 2 procent inhibicji w poszczególnych powtórzeniach okazał się różny.

Tabela 2

Infekcyjność TMV w liściach tytoniu *Nicotiana glutinosa* pod wpływem skopoletyny

Czas inkubacji (godz.)	Ogólna powierzchnia liści (cm <sup>2</sup> )		Średnia liczba nekroz na 1 cm <sup>2</sup> powierzchni liścia		Zahamowa- nie infekcyj- ności (%)
	rośliny próbne	rośliny kontrolne	rośliny próbne	rośliny kontrolne	
24	243,6	243,6	0,26	0,30	13,5
	259,8	259,8	0,54	0,99	40,6
	251,8	251,8	2,02	2,94	31,3
Średnio	251,7	251,7	0,94	1,41	28,5
48	286,9	295,0	2,11	2,71	22,1
	293,5	293,5	6,91	13,60	43,9
	266,2	262,0	1,19	1,62	27,8
Średnio	282,2	283,5	3,40	5,98	31,3
72	294,4	277,6	1,29	1,56	17,3
	255,5	255,5	9,07	16,15	43,8
	272,2	272,2	1,94	2,88	32,1
Średnio	274,0	268,4	4,10	6,86	31,1

Istotnym czynnikiem była pora roku, w której doświadczenia przeprowadzono w warunkach szklarniowych, gdyż rośliny dobierano do zakazenia w jednakowej fazie rozwoju wegetacyjnego.

Test połówek liściowych (tab. 3), zastosowany do określenia wpływu

Tabela 3

Infekcyjność TMV w liściach tytoniu *Nicotiana glutinosa* traktowanego parami skopoletyny

Czas inkubacji (godz.)	Średnia liczba nekroz na 1 cm <sup>2</sup> powierzchni liścia		Zahamowanie infekcyjności (%)
	rośliny próbne	rośliny kontrolne	
24	2,0	2,9	31,3
48	2,1	2,7	22,1
72	1,3	1,6	17,3

par skopoletyny na wirus dał różne wyniki w zahamowaniu infekcyjności.

Doświadczenie przeprowadzone na 4 i 5 liściu (tab. 3), wykazało wyraźnie słabnące działanie skopoletyny jako inhibitora, w miarę przedłużania inkubacji.

W wyniku oznaczenia przyrostu świeżej masy krążków z liści tytoniu, po 72 godzinach moczenia ich w roztworach (tab. 4), nie stwierdzono

Tabela 4

Przyrost świeżej masy krążków z liści tytoniu po 72 godz. moczenia w pożywce z dodatkiem skopoletyny

Rodzaj podłoża	<i>Nicotiana glutinosa</i>	Przyrost świeżej masy (średnia z powtórzeń)		Przyrost średnicy krążków (mm)
		g	%	
Pożywka sacharozowa	rośliny nieinfekowane	0,4606	58,6	6,3
	rośliny infekowane TMV	0,3593	49,1	6,3
Pożywka sacharozowa 100 mg/l skopoletyny	rośliny nieinfekowane	0,4235	58,5	6,6
	rośliny infekowane TMV	0,4108	54,2	6,5

istotnych różnic między tkankami pochodzącymi z roślin zdrowych i infekowanych wirusem, jak również między tkankami traktowanymi tylko pożywką sacharozową i pożywką z dodatkiem skopoletyny. Występujące różnice są tak niewielkie, że mieszczą się w granicach błędu. Stwierdzono natomiast, że skopoletyna wywiera pewien wpływ na lepsze uwodnienie tkanek, co znajduje potwierdzenie w przyroście średnicy krążków.

Rośliny zdrowe, poddane działaniu skopoletyny w różnym stężeniu (tab. 5), wykazały słabszy przyrost świeżej masy w stosunku do roślin kontrolnych. Natomiast rośliny infekowane wirusem mozaiki tytoniu wykazały odmienną reakcję na zróżnicowanie dawki skopoletyny. W niższych stężeniach, od 5 do 200 ppm, zaznaczyła się stymulacja przyrostu świeżej masy tkanek, a począwszy od koncentracji 250 ppm nastąpił spadek przyrostu świeżej masy tkanek. Stwierdzono także, począwszy od koncentracji skopoletyny w wysokości 50 ppm, pojawienie się charakterystycznego brunatnienia brzegów krążków, co można przyjąć za rodzaj bariery dla penetracji związków o wyższej niż fizjologiczna koncentracji.

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Uzyskane wyniki doświadczeń przeprowadzonych na tytoniu *Nicotiana glutinosa* potwierdziły raz jeszcze fakt, że skopoletyna, podobnie jak wiele innych pochodnych kumaryny, w zależności od stężenia w jakim jest wprowadzona do organizmu, może ujawnić swe właściwości w stosunku do roślin bądź jako inhibitor, bądź też jako stymulator procesów fizjologicznych [1, 12]. Odporność fizjologiczna istniejąca u organizmów, a kryjąca się w specyfice przemiany materii lub we właściwościach cytoplazmy,

Tabela 5

Przyrost świeżej masy krążków z liści zdrowych i infekowanych TMV, roślin tytoniu *Nicotiana glutinosa*, po 72 godz. traktowania skopoletyną

Rośliny	Rodzaj podłoża	Stężenie skopoletyny (ppm)	Przyrost masy (%)
Zdrowe	roztwór wodny skopoletyny	5	34,1
		50	28,4
		100	29,7
		200	34,8
		250	31,2
		500	48,4
		750	40,0
		1000	41,8
		woda destylowana	—
Szczepione TMV	roztwór wodny skopoletyny	5	34,9
		50	42,5
		100	32,0
		200	41,0
		250	28,5
		500	28,6
		750	27,5
		1000	29,8
		woda destylowana	—

jest najmniej znana i najtrudniejsza do poznania. Skopoletyna wprowadzona poprzez sytem korzeiowy, a więc w sposób najbardziej normalny dla rośliny, bez jej uszkodzeń, spowodowała stymulację rozwoju liści. Jej inhibujące właściwości pojawiły się natomiast w stosunku do wytwarzanej przez rośliny powierzchni blaszek liściowych i rozmiarów systemu korzeniowego u tytoniu. Potwierdziło to wcześniejsze obserwacje dotyczące rozwoju korzeni owsa. Stwierdzone zjawiska wystąpiły u roślin, które poddane zostały sztucznej infekcji wirusem mozaiki tytoniu.

Samoistne pojawienie się skopoletyny w stanach patologicznych u roślin tytoniu, wskazuje na istnienie ścisłego związku między metabolitami i syntezą wirusów w roślinie-gospodarzu. Skopoletyna wprowadzona do organizmu sztucznie również ograniczała infekcyjność TMV średnio o 30%, bez względu na zastosowaną technikę w przeprowadzonych doświadczeniach. Infekcyjność wirusa w roślinach traktowanych uprzednio skopoletyną i bezpośrednio traktowanego parami tego związku, okazała się podobna. Interesujące jest słabnące oddziaływanie skopoletyny na wirus w miarę przedłużonego okresu inkubacji. Możliwe, że w tym oddziaływaniu występuje zjawisko podobne jak w przypadku kumaryny, czyli

gwałtowna reakcja w pierwszym okresie po zetknięciu się z tym związkiem. Następnie daje się zauważyć jakby naturalizacja do nowych, zmienionych warunków. W odniesieniu do kumaryny stwierdzono to wielokrotnie. Uzyskana wysoka zgodność wyników co do stopnia inhibicyjnych właściwości skopoletyny, stwierdzona *in vivo* i *in vitro*, może świadczyć o oddziaływaniu tego związku bezpośrednio na wirus, w rozpatrywanym układzie wirus — roślina. Oznaczenia przyrostu świeżej masy tkanek pochodzących z liści tytoniu zdrowych i infekowanych TMV, nie wykazały istotnych różnic.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń z roślinami w warunkach szklarniowych i przy utrzymaniu stałej temperatury, mogą odbiegać od uzyskanych w warunkach naturalnych.

#### LITERATURA

1. Andreae S. R., Andreae W. A.: The metabolism of scopoletin in healthy and virus infected potato tubers. *Can. J. Res.*, 1949, t. 27, s. 15-22
2. Bawden F. C., Kassanis B.: Some effects of thiouracil on virus infected plant. *J. gen. Microbiol.*, 1954, t. 10, s. 160-173
3. Blaim K.: Niektóre zagadnienia związane z występowaniem związków kumarynowych i cyjanowodorowych w świecie roślinnym. *Hod. Rośl. Aklim. Nas.*, 1960, z. 1, s. 431
4. Blaim K.: Swoiste substancje roślin uprawnych, PWRiL, Warszawa 1965, s. 308
5. Corbett M. K., Sisler H. D.: *Plant Virology*, Rose Printing Company Inc. Tallah. Florida, 1959, s. 211-234
6. Goodman R. N., Kiraly Z., Zaitlin M.: *The biochemistry and physiology of infectious plant disease*. New York, Van Nostrand Co. 1967
7. Gubański M.: Metody hodowli i ilościowych oznaczeń wirusa mozaiki tytoniowej. *Wiad. bot.*, 1961, s. 5, s. 19-30
8. Knight C. A.: *Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung, Band IV, Chemistry of Viruses: 1963*, s. 13-14
9. Knypl J. S.: Naturalne i syntetyczne regulatory wzrostu i rozwoju roślin II. *Post. Nauk rol.*, 1966, z. 5, s. 49-78
10. Loebenstein G.: Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants. *Phytopath.*, 1963, t. 53, z. 3, 306-308
11. Maciejewska-Potapczykowa W.: Substancje wzrostowe roślin. PWRiL, Warszawa 1967, s. 438
12. Michniewicz M.: Endogenne inhibitory wzrostu jako czynniki regulujące wzrost i rozwój roślin. *Wiad. bot.*, 1966, z. 10, s. 151, 167
13. Miczyński K.: Z nowszych poglądów na zagadnienie odporności roślin na choroby wirusowe. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1971, z. 115, s. 13-23
14. Mundry K. W.: Plant virus — host cell relations. *Ann. Rev. Phytopath.*, 1963, z. 1, s. 173-196
15. Reed D. J., Moore T. C., Anderson J. D.: Plant growth retardants B 995: a possible mode of action. *Science*, 1965, z. 148, s. 1469-1475
16. Sargent J. A., Skoog F.: Effects of indoleacetic acid kinetin on scopoletin-skopolin levels in relation to growth of tobacco tissue *in vitro*. *Pl. Physiol.*, 1960, t. 35, s. 934-941

17. Skoog F., Montaldi E.: Auxin-kinetin interaction regulating the skopoletin and skopolin levels in tobacco tissue cultures. Nat. Acad. Sci. Proc., 1961, t. 47, s. 36-49
18. Tso T. G., Burk L. G., Dieterman L. J., Wender S. H.: Skopoletin, skopolin and chlorogenic acid in tumors of interspecific *Nicotiana hybrids*. Nautre, 1964, t. 204, z. 4960, s. 779-780
19. Utech M. N., Johnson J.: The inactivation of plant viruses by substances obtained from bacteria and fungi. Phytopath., 1950, t. 40, s. 247

*Антонина Микульска-Махета*

## ВЛИЯНИЕ СКОПОЛЕТИНА НА ИНФЕКЦИОННОСТЬ ВИРУСА МОЗАИКИ ТАБАКА В РАСТЕНИЯХ ТАБАКА

### Резюме

Появление скополетина в патологических состояниях растений указывает на существование тесной связи между метаболитами и синтезом вирусов в растении-хозяине. Установлено, что скополетин искусственно введенный в жидком виде в организм, тормозит развитие ассимиляционной поверхности растений, а также развитие корневой системы. Стимулирующее действие скополетина обнаружилось в количестве развивающихся на растениях листьев.

Таким образом, еще раз были подтверждены, по отношению к процессам происходящим в растении двойные свойства скополетина, как ингибитора и стимулятора. Скополетин применяемый в низких концентрациях благоприятствует обезвоживанию тканей растений здоровых и подверженных инфекции вирусом. Установлено же безусловное тормозящее влияние скополетина в исследуемых концентрациях на активность вируса мозаики табака *in vitro* и в пределах тканей растения.

*Antonina Mikulska-Macheta*

## INFLUENCE OF SCOPOLETIN ON THE INFECTIVITY OF TOBACCO MOSAIC VIRUS IN TOBACCO PLANTS

### Summary

Scopoletin is a substance with specific physiological activity. The appearance of scopoletin in larger quantities in diseased plants indicates a close connection between these metabolites and virus synthesis.

The study was undertaken to follow the reaction of young tobacco plants *Nicotiana glutinosa*, both healthy and infected with TMV to scopoletin which was introduced from a solution through the root system, and through the leaf blades. Scopoletin, used in studies on the infection of plants by TMV showed an evident inhibition of virus infectivity within host tissues and *in vitro*.