

BADANIA CYTOLOGICZNE KIEŁKÓW ZIEMNIAKA PORĄŻONYCH WIRUSEM LIŚCIOZWOJU

Grażyna Garbaczewska

Instytut Biologii Roślin SGGW-AR, Warszawa

Problem chorób wirusowych ziemniaka, a zwłaszcza liściozwoju, należy do istotnych ze względów zarówno poznawczych, jak i gospodarczych. Choroba zwana liściozwojem spowodowana jest przez wirus, który należy do małych ikosaheralnych wirusów roślinnych o średnicy 23-25 nm. Obecność wirusa liściozwoju ziemniaka wywołuje znaczne obniżenie plonu. Ponadto dla pewnych odmian ziemniaka została stwierdzona reakcja nietolerancji w stosunku do wirusa liściozwoju, która polega na różnicowanej reakcji kiełkowania oczek bulw [1]. Dotychczas brak jest cytologicznych dowodów obecności cząstek wirusów w komórkach merystematycznych stożków wzrostu pędu czy korzenia. Nie stwierdzono również cząstek wirusów w komórce jajowej, chociaż są prace potwierdzające obecność wirusów roślinnych w mikrosporach [2], czy w soku z komórek merystematycznych stożków wzrostu pędu [8]. Celem podjętych badań było stwierdzenie, czy cząstki wirusa PLRV są obecne w komórkach merystemów oczek bulw różnych odmian ziemniaka, czy zachodzą w tych komórkach zmiany cytopatologiczne oraz czy zmiany zachodzące w komórkach floemu kiełków świetlnych są analogiczne do opisanych dla pędów nadziemnych ziemniaka [5].

MATERIAŁ I METODY

Do badań pobierano materiał z oczek bulw ziemniaków odmian Apta, Bolko i Uran, roślin zdrowych i porażonych wirusem PLRV. Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano fragmenty tkanek ze stożków wzrostu oraz wiązek przewodzących oczek bulw w stanie spoczynku oraz kiełków świetlnych różnej wielkości. Tkanki utrwalano w utrwalaczu Karnovsky'ego [7], który składa się z mieszaniny 3% glutaraldehydu

i 4% paraformaldehydu na buforze kakodylanowym o pH 7,2 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie materiał dodatkowo utrwalano 1% OsO₄ przez 2 godziny w temperaturze 4°C, odwadniano w rosnących stężeniach alkoholu, acetonu i tlenku propylenu i zatapiano w Eponie 812. Otrzymany materiał krajano na ultramikrotomie LKB. Ultra-cienkie skrawki dodatkowo barwiono cytrynianem ołowiu i octanem uranylu. Obserwacje i dokumentację wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100 C.

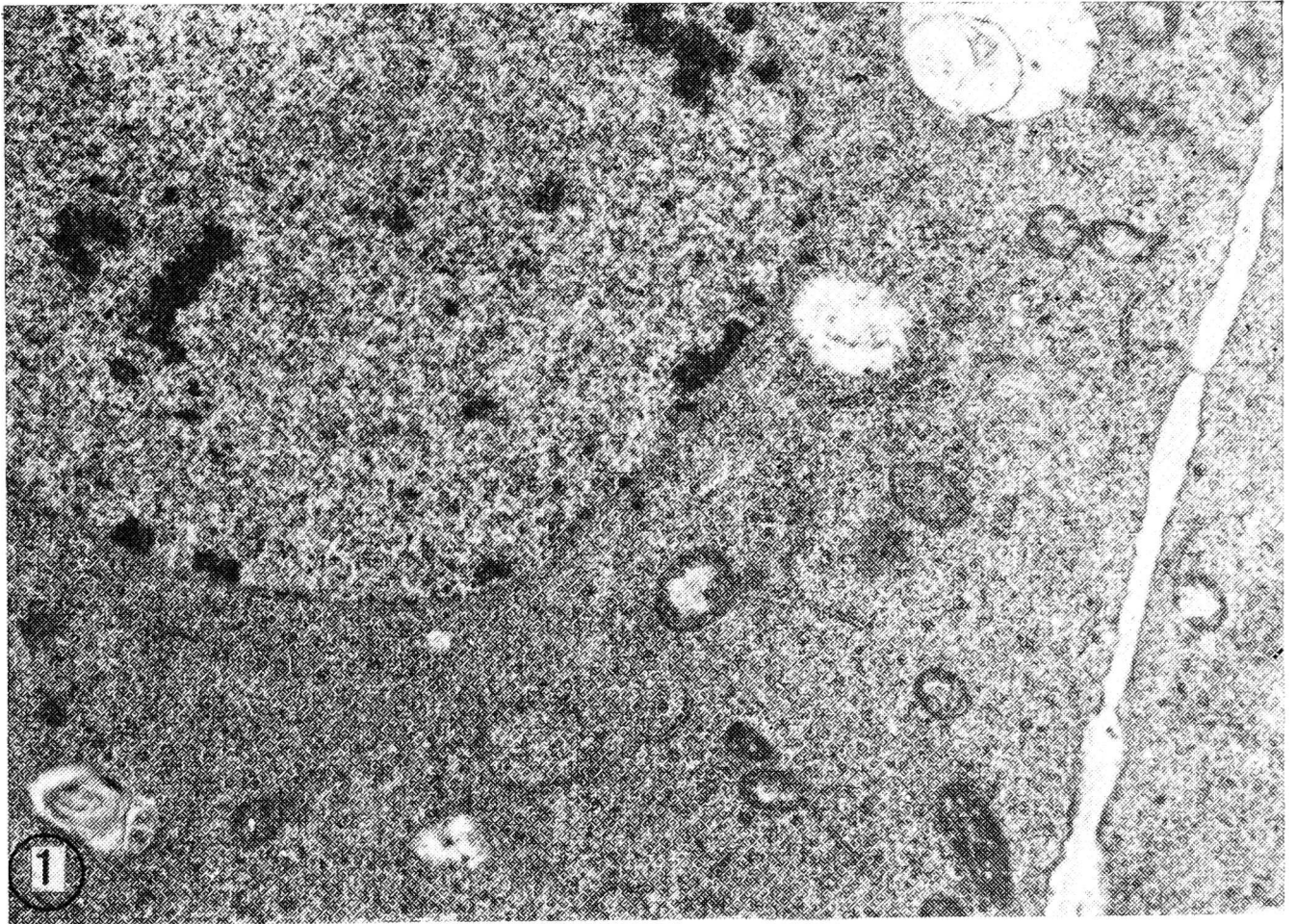
WYNIKI

Prowadzone były obserwacje komórek merystematycznych pobranych z wycinków stożków wzrostu kielków świetlnych bulw roślin zdrowych i porażonych wirusem PLRV oraz komórek różnicujących się i zróżnicowanych tkanek przewodzących. W komórkach merystematycznych pochodzących z kielków świetlnych bulw roślin porażonych wirusem PLRV nie znaleziono cząstek wirusa ani nie zaobserwowano zmian strukturalnych, które różniłyby te komórki od komórek tkanki twórczej ziemniaków zdrowych (ryc. 1).

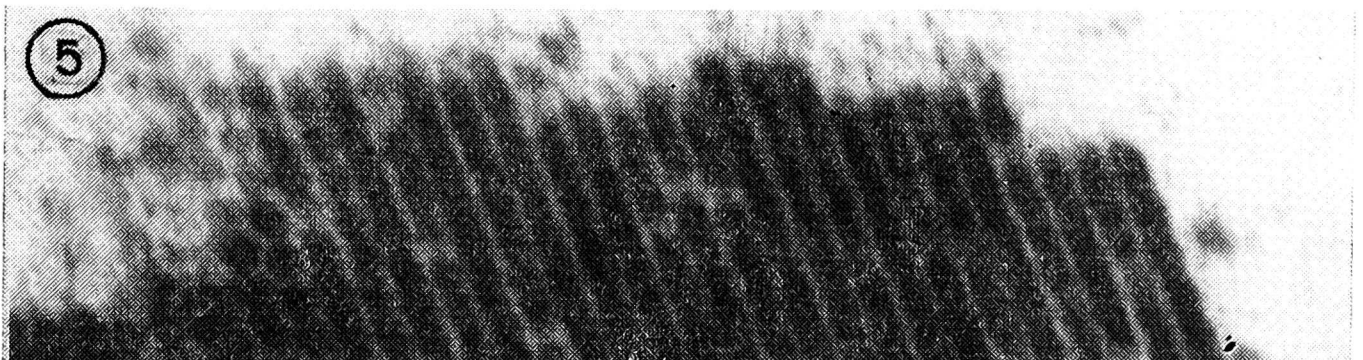
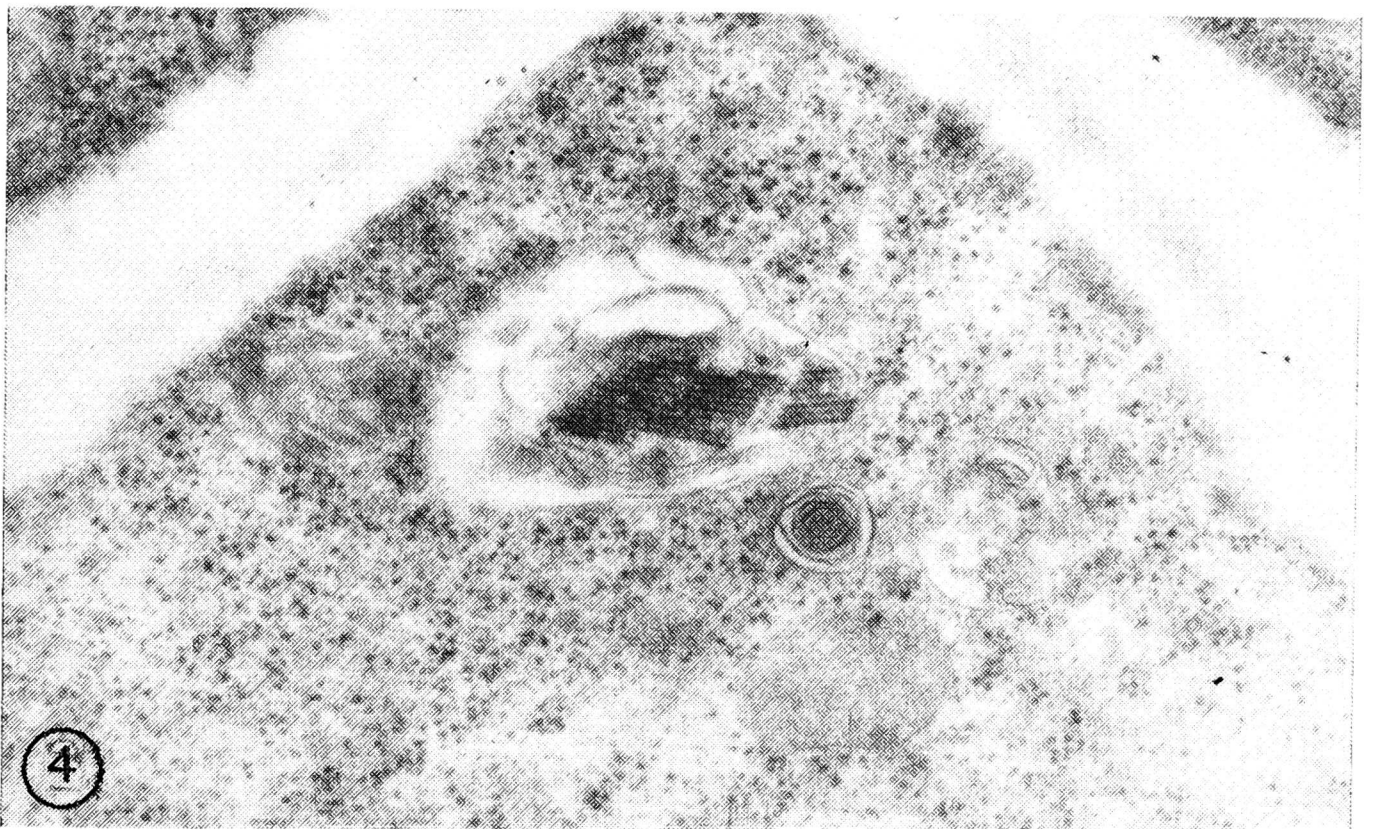
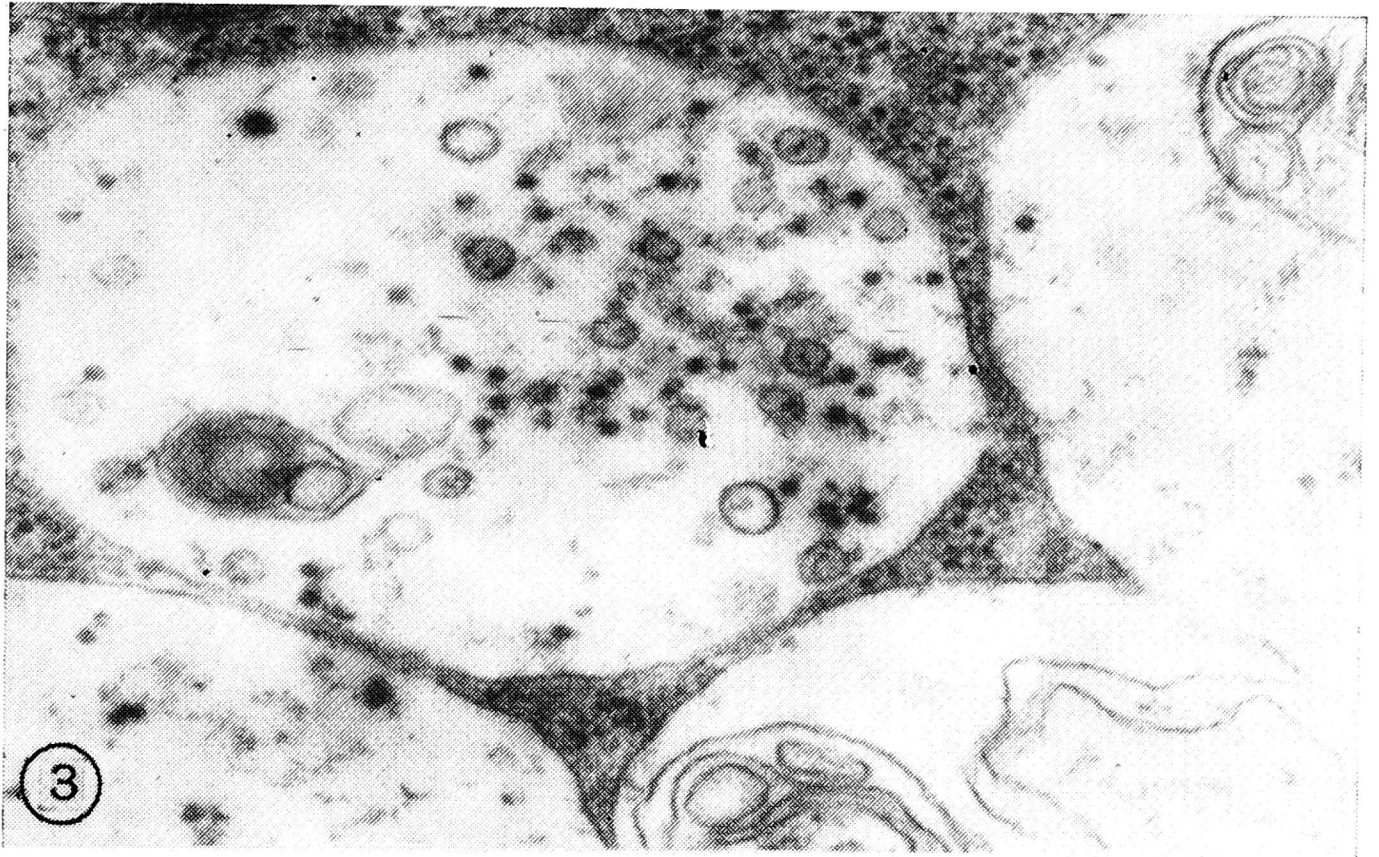
Cząstki PLRV o średnicy około 25 nm zostały zidentyfikowane we floemie kielków świetlnych z bulw porażonych liściozwojem. Cząstki te mają kształt kulisty i mogą tworzyć bardzo regularne układy zwane krystalicznymi (ryc. 4-6).

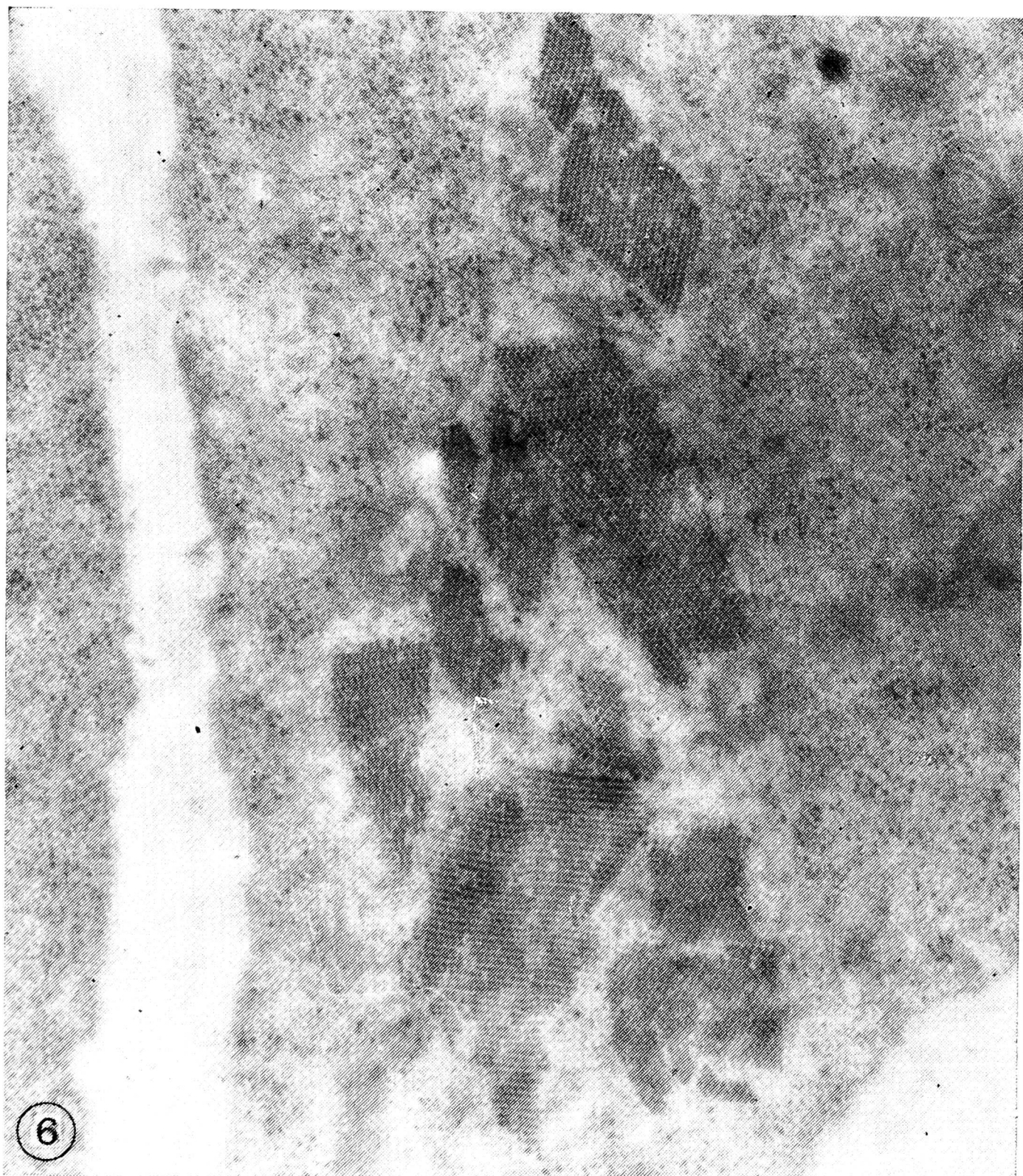
Krystaliczne układy cząstek PLRV obserwowano w komórkach towarzyszących. Są one zlokalizowane na terenie wyodrębnionym w cytoplazmie przez błonę białkowo-lipidową. Obserwowano również inkluzje PLRV złożone z równoległych szeregów kulistych cząstek otoczone dodatkowymi błonami (ryc. 4). Obok układów krystalicznych występują pojedyncze cząstki, struktury pęcherzykowate z włóknistą zawartością oraz ciała wielopęcherzykowate (ryc. 3). W rurkach sitowych i komórkach towarzyszących roślin porażonych PLRV obserwowano struktury cytopatologiczne: osmofilny materiał złożony z fibryli 3-4 nm w cytoplazmie, plazmodesmach i porach płytek sitowych (ryc. 11) struktury tubularne podobne do mikrotubul o średnicy 20 nm (ryc. 9), ciała pęcherzykowate i wielopęcherzykowate z zawartością materiału włóknistego oraz zwiększone ilości kalozy na płytkach sitowych (ryc. 11).

W niefunkcjonujących, znekrotyzowanych elementach sitowych obserwowane były cząstki PLRV tworzące nieregularne układy (ryc. 7). W komórkach miękiszu łykowego nie obserwowano cząstek PLRV. W komórkach tych oraz w komórkach towarzyszących występowały agregacje bardzo długich pałeczkowatych struktur o średnicy około 15 nm (ryc. 11, 12). W komórkach tych obserwowane były również układy równoległe

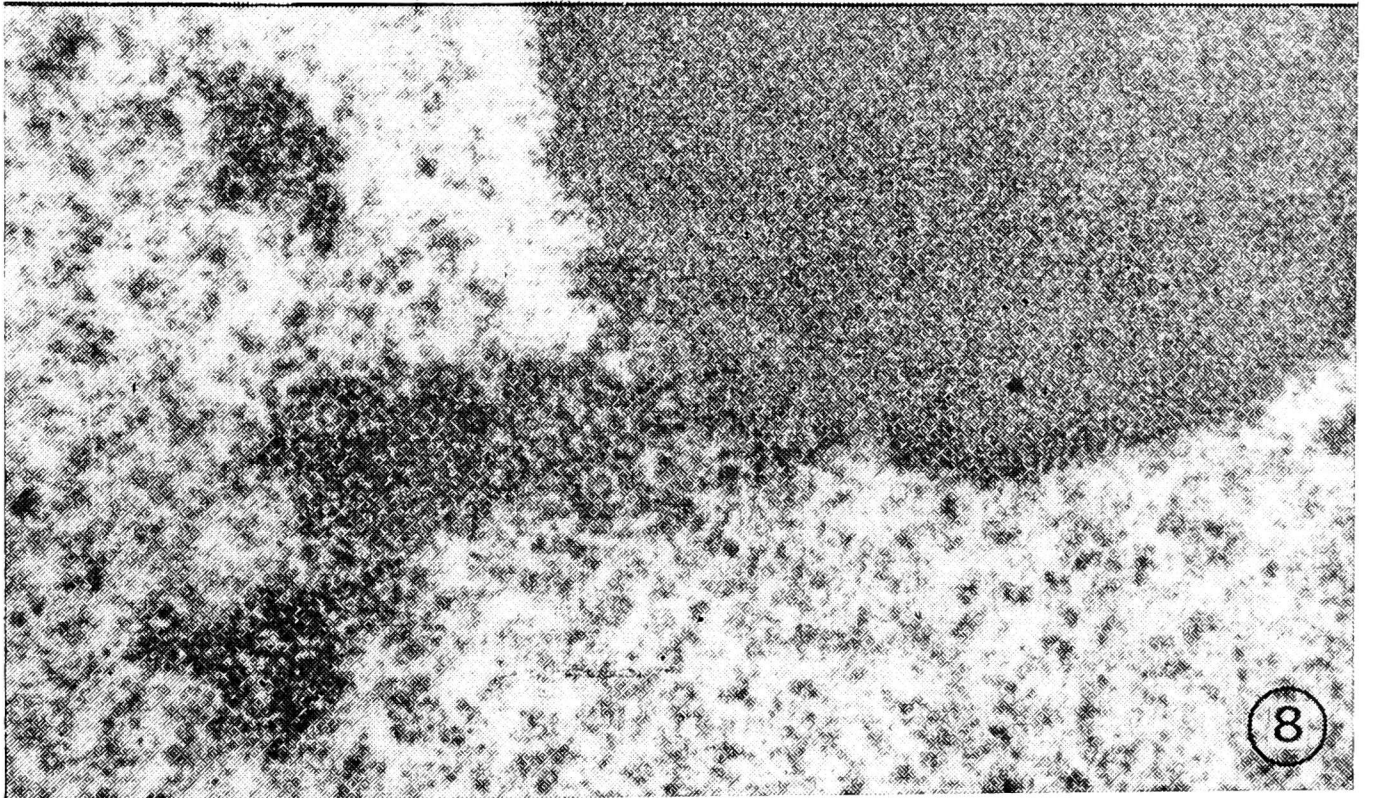
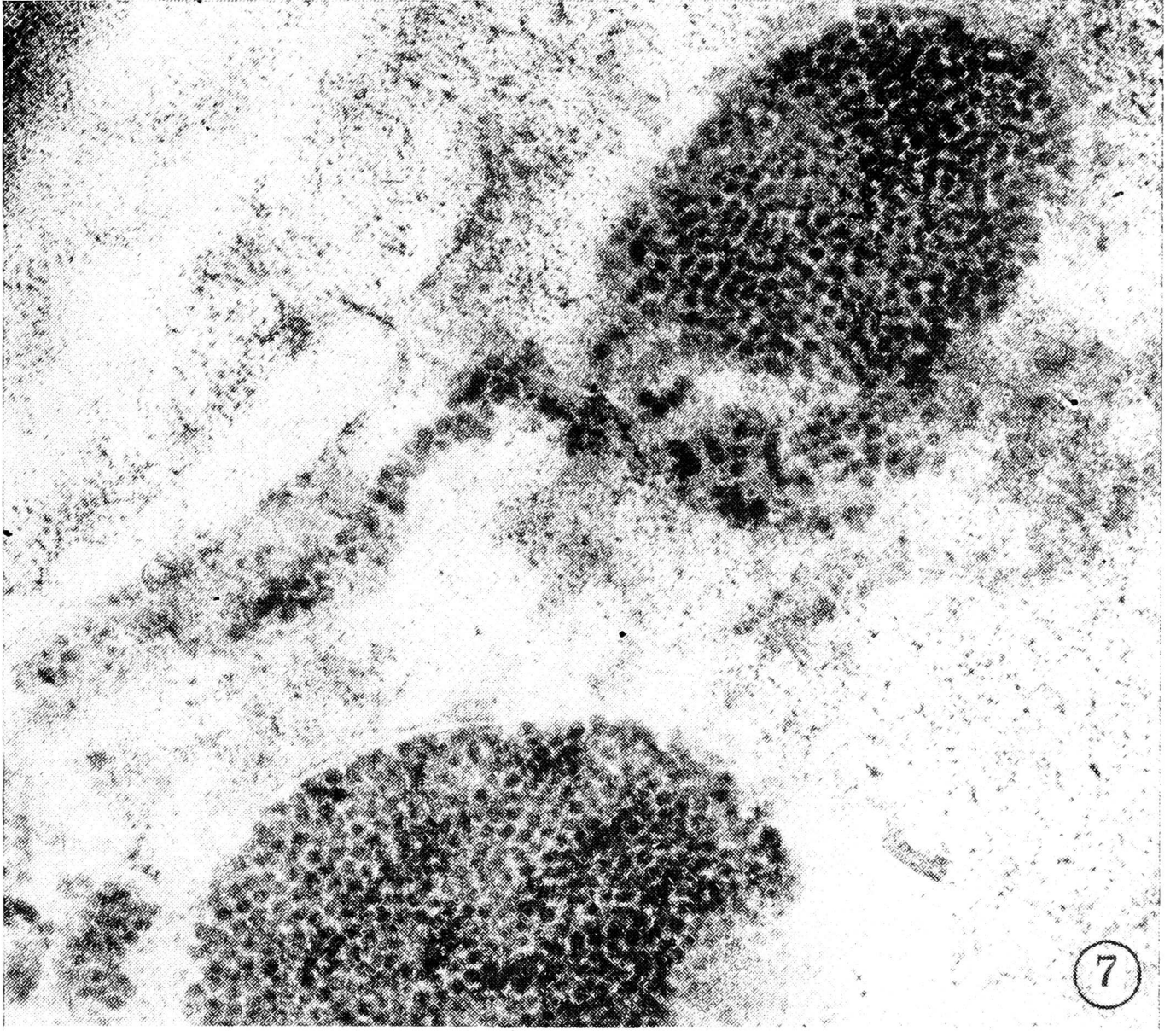


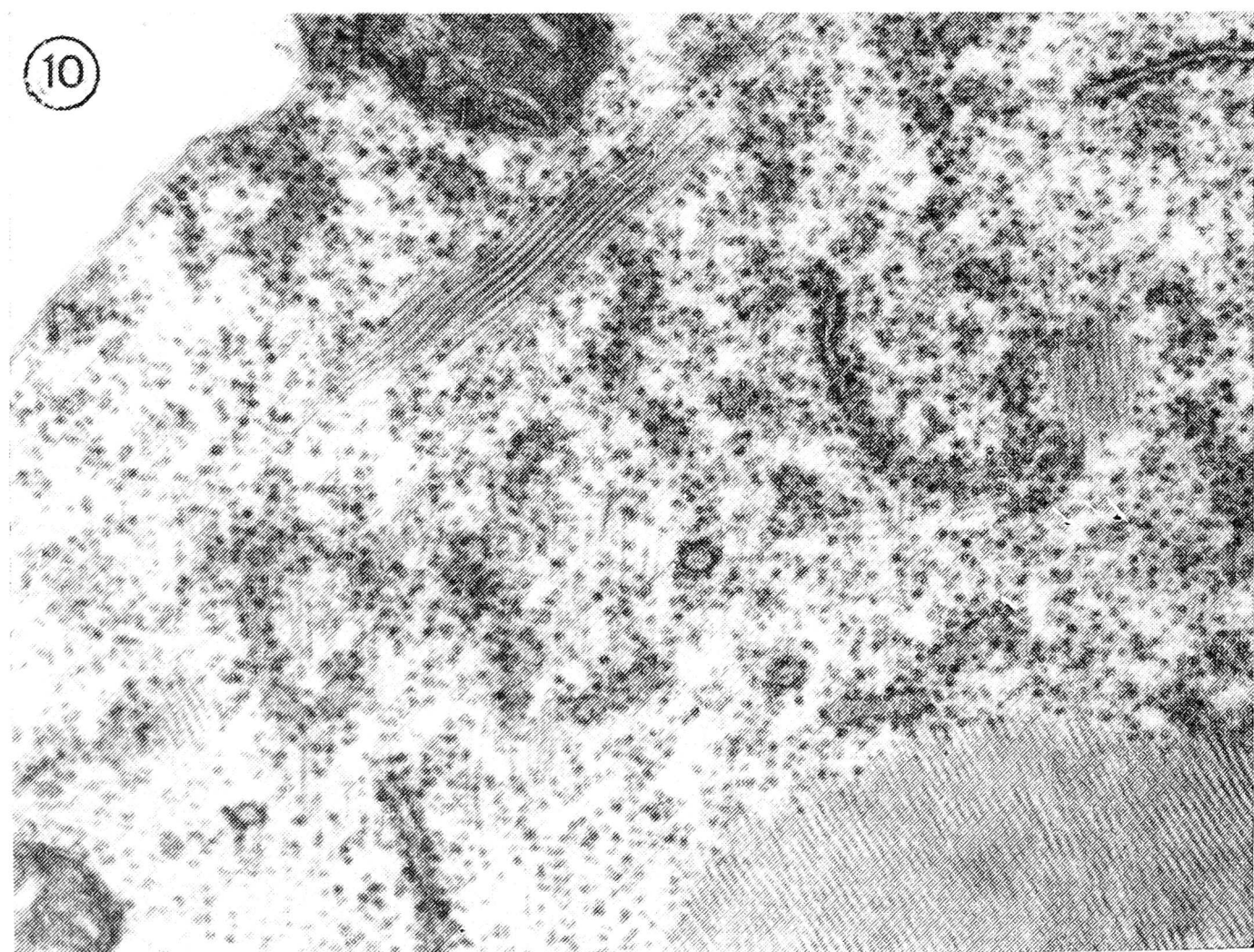
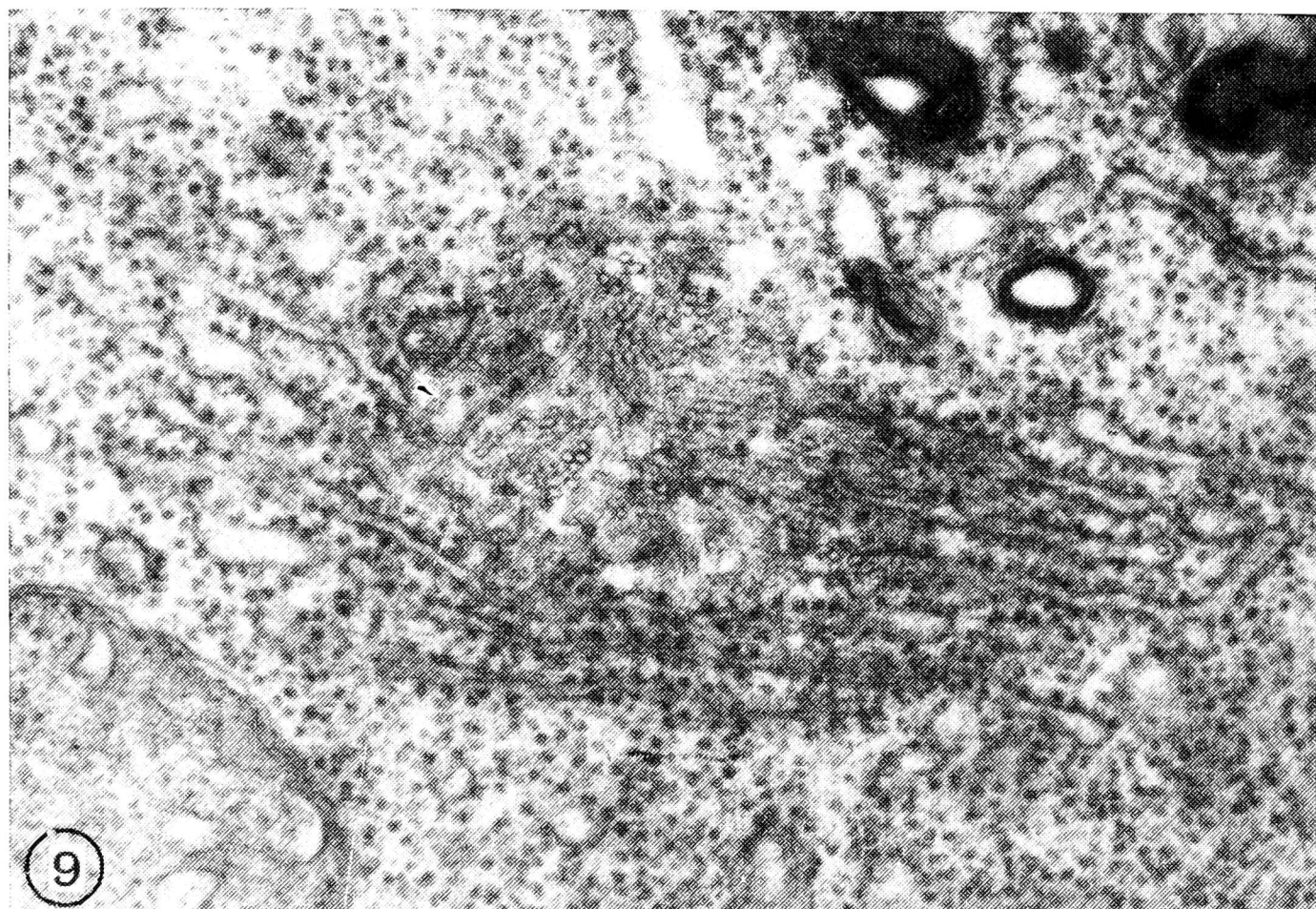
- Ryc. 1. Fragment komórki merystematycznej z kielka świetlnego porażonego PLRV. Widoczne duże jądro komórkowe, cienka ściana komórkowa, cytoplazma z licznymi rybosomami oraz mitochondria (10 000 ×)
- Ryc. 2. Przekrój poprzeczny przez 3 rurki sitowe i otaczające komórki towarzyszące. W komórce towarzyszącej widoczny równoległy układ retikulum endoplazmatycznego (10 000 ×)
- Ryc. 3. Wyodrębnione miejsca zawierające pojedyncze cząstki PLRV, struktury włókniste i pęcherzykowate oraz zwinięte układy błon. Przekrój przez komórkę towarzyszącą (50 000 ×)
- Ryc. 4. Układ krystaliczny cząstek PLRV odizolowany szeregiem błon od cytoplazmy podstawowej. Komórka towarzysząca (30 000 ×)
- Ryc. 5. Cząstki PLRV w układzie krystalicznym tworzące równoległe szeregi. Cząstki mają średnicę 23 nm (150 000 ×)





Ryc. 6. Układy krystaliczne cząstek PLRV otoczone błoną białkowo-lipidową. Widoczne również pojedyncze cząstki wirusa oraz szereg zwiniętych błon białkowo-lipidowych. Komórka towarzysząca (30 000 ×)



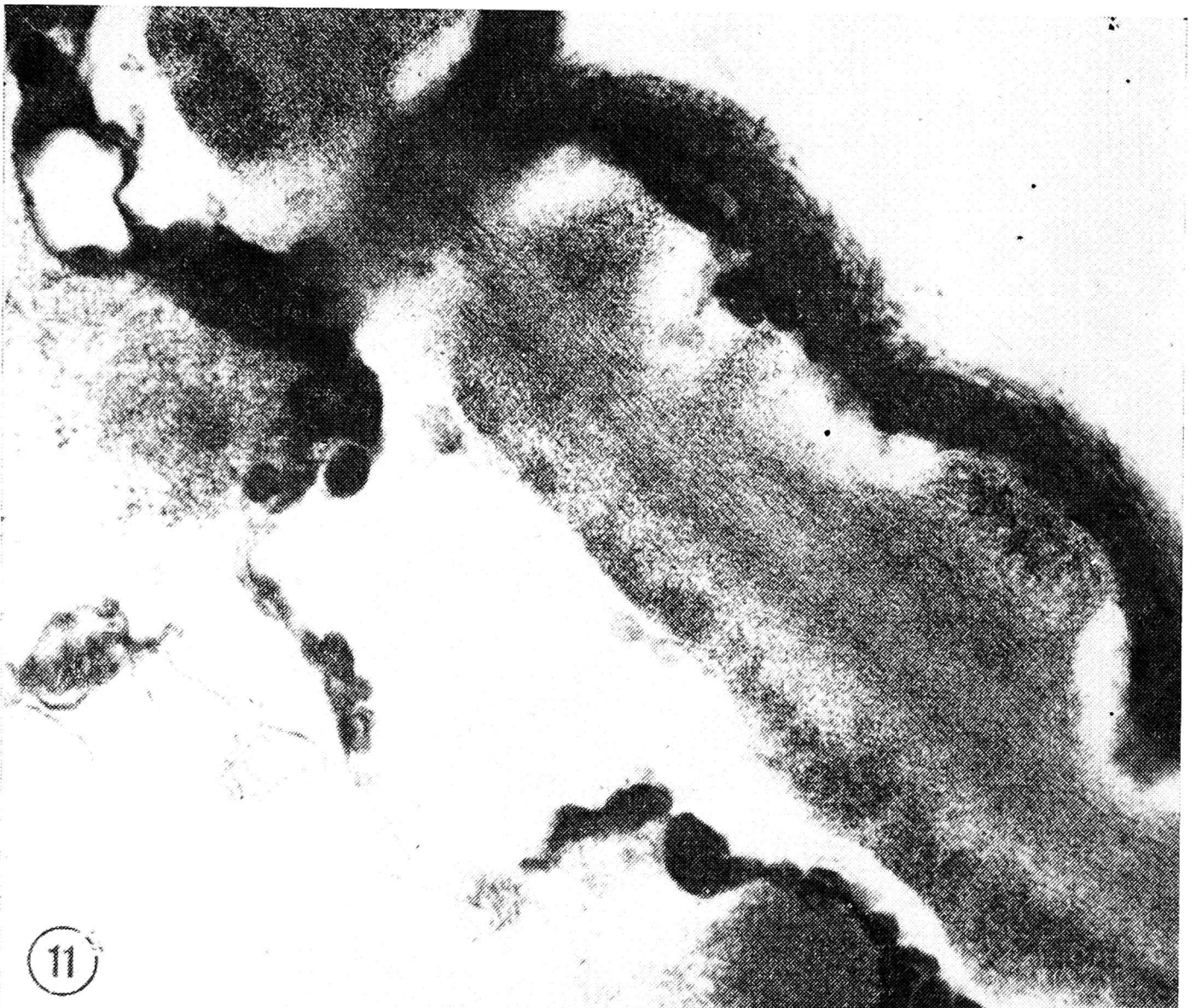


Ryc. 7. Cząstki PLRV w układzie nieregularnym w elemencie sitowym, który uległ nekrozie. W pobliżu grup cząstek PLRV widoczne fragmenty błon (66 000 ×)

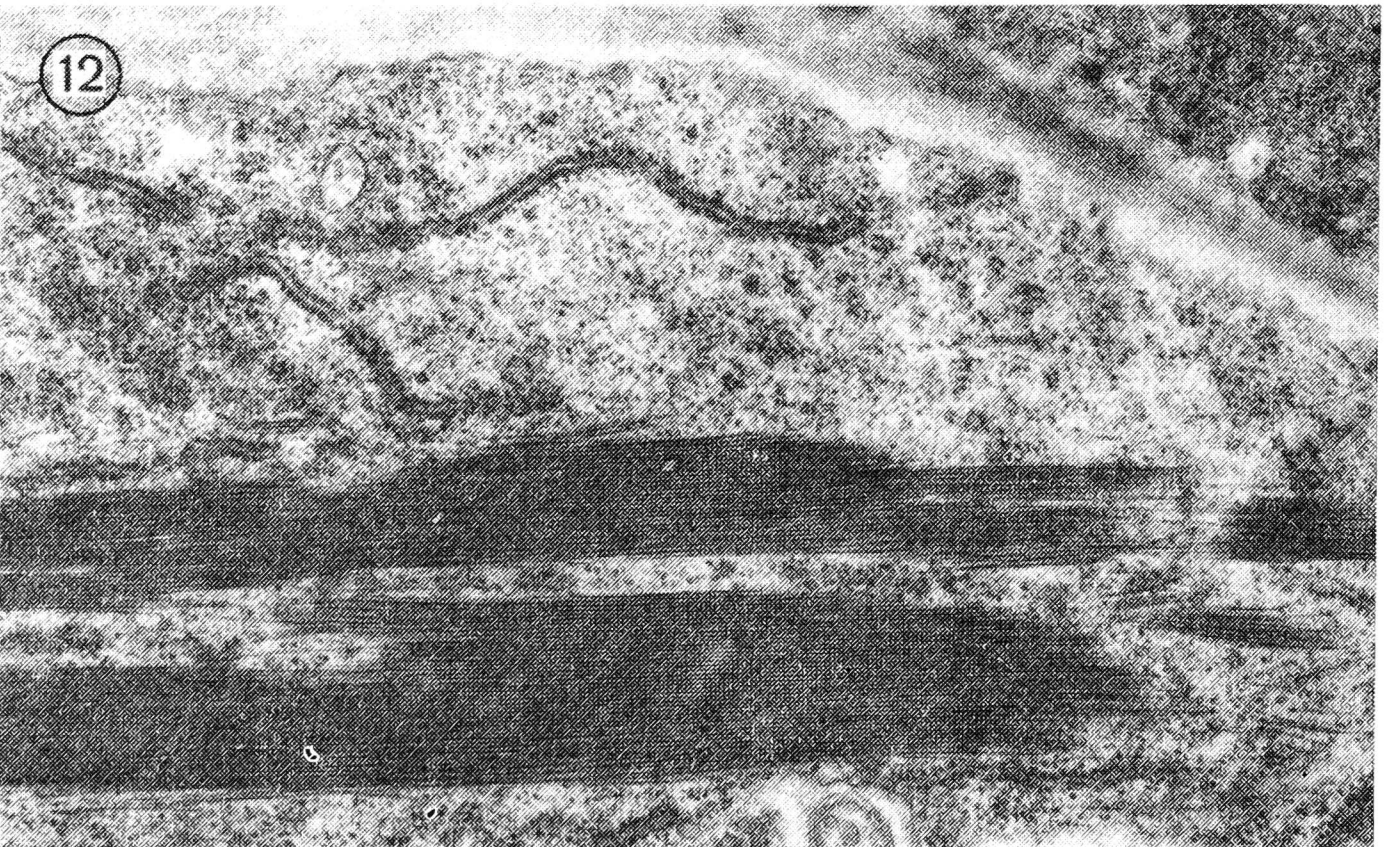
Ryc. 8. Fragment jądra komórkowego z jąderkiem. W części peryferycznej jąderka rozluźnienie struktury: widoczne pęcherzyki o średnicy około 50 nm (40 000 ×)

Ryc. 9. Fragment komórki miękiszowej, w której widoczny jest przekrój przez układ szorstkiego reticulum endoplazmatycznego oraz zgrupowanie mikrotubul o średnicy około 20 nm. Wewnątrz kanałów ER widoczne mikrotubule (40 000 ×)

Ryc. 10. Fragment komórki miękiszowej. Widoczne ER oraz struktury pałeczkowate różnej długości o średnicy około 15 nm. Część z nich to krótkie formy rozrzucone w cytoplazmie w bliskim sąsiedztwie rybosomów, inne tworzą inkluzje równoległych, długich form (40 000 ×)



11



12

Ryc. 11. Przekrój podłużny przez płytę sitową pokrytą dużą ilością kalozy. Na powierzchni płytki oraz w jej porze widoczna osmofilna substancja złożona z drobnych (3-4 nm) fibrylli (60 000 \times)

Ryc. 12. Fragment komórki mięsiskowej. Widoczne inkluzje złożone z długich pałeczkowatych struktur o średnicy około 15 nm (20 000 \times)

i koncentryczne endoplazmatycznego retikulum (ryc. 2). System endoplazmatycznego retikulum jest bardzo rozbudowany. W jego cysternach jest często widoczny osmofilny materiał (ryc. 9).

W cytoplazmie występują krótkie, pałeczkowate struktury rozrzucone nieregularnie oraz kilkakrotnie lub kilkanaście razy dłuższe od nich ułożone równolegle względem siebie struktury o tej samej średnicy, tzn. 15 nm (ryc. 10). Struktury te nie mają bezpośredniego kontaktu z błonami endoplazmatycznego retikulum. W powiązaniu z granularnym ER obserwowano mikrotubule o średnicy 20 nm (ryc. 9). Tablica ta przedstawia przekrój przez układ ER i mikrotubul. We wnętrzu kanalików endoplazmatycznego retikulum obecne są mikrotubule.

W badanym materiale nie stwierdzono cząstek PLRV w jądrze, natomiast obserwowano zmiany struktury jąderka. W jego części peryferycznej często tworzyły się uwypuklenia w rozluźnionej, granularnej strukturze (ryc. 8). W tej rozbudowanej strefie jąderka były pęcherzyki o średnicy 50 nm.

DYSKUSJA

Problem obecności cząstek wirusów w komórkach merystematycznych jest szeroko dyskutowany w literaturze [6]. Brak jest cytologicznych dowodów obecności wirusów w stożkach wzrostu pędu. W badanym materiale kiełków świetlnych odmian ziemniaka różnie reagujących na obecność PLRV również nie została potwierdzona obecność cząstek wirusa w komórkach merystematycznych. We floemie kiełków świetlnych roślin porażonych PLRV zidentyfikować można cząstki wirusa oraz analogiczne struktury cytopatologiczne, jakie opisano dla floemu łodygi i liści [5]. Niemniej jednak zmiany wywołane przez PLRV w krótkim czasie po inokulacji w komórkach towarzyszących i w miękiszu łykowym dotyczą struktury jądra komórkowego, w którym obserwowano cząstki PLRV oraz zmiany w organizacji chromatyny [5]. W badanym materiale struktura jąderka wskazywała na wzmożoną aktywność związaną z wytwarzaniem pęcherzykowatych struktur, które być może zawierają kwasy nukleinowe wirusa i polimerazę. W jądrze nie obserwowano cząstek PLRV.

Układy krystaliczne wirusa zlokalizowane są w ograniczonym przez błonę białkowo-lipidową miejscu. Murayama i Kojima [10] przedstawiają analogiczne układy PLRV i interpretują je jako układy cząstek występujące w soku komórkowym. Można jednak przypuszczać na podstawie przeprowadzonych obserwacji, że początkowo w cytoplazmie tworzą się niewielkie obszary oddzielające się układem błon, które są miejscem gromadzenia się komponentów wirusa, łączenia białek i kwasów nukleinowych w wiriony, a wreszcie tworzenia charakterystycznych inkluzji

PLRV. Komórki towarzyszące i miękisz łykowy kielków świetlnych mają silnie rozbudowany system ER, który często tworzy specyficzne układy. Podobną organizację błon ER opisują w literaturze autorzy prowadzący badania nad organami spoczynkowymi [13] oraz nad tkankami, w których za pomocą inhibitorów oddychania wywoływano deficyt tlenowy [12]. W komórkach towarzyszących i komórkach miękiszu floemowego roślin porażonych PLRV obserwuje się wyraźnie zwiększoną liczbę mikrotubul w cytoplazmie, a nie tylko w połączeniu z rozbudową ściany komórkowej. Mikrotubule widoczne są obok błon szorstkiego ER, a nawet wewnątrz kanałów ER, które wypełnione są osmofilną substancją. Wskazuje to na udział granularnego ER w transporcie i agregowaniu podjednostek białkowych mikrotubul. Taki tubularny materiał opisany był przez Esau [3] dla infekcji TMV i nazwany X tubulami. Podobnie w komórkach towarzyszących i komórkach miękiszu floemowego stwierdzono występowanie struktur pałeczkowatych o średnicy 15 nm, o różnej długości. Przypuszczać można, że powstające inkluzje są wynikiem wytwarzania białek w komórce roślinnej, które agregują w różnego typu struktury.

LITERATURA

1. Butkiewicz H.: Nietolerancja w stosunku do wirusa liściozwoju występująca u roślin ziemniaka. Rozprawa doktorska. Młochów, 1974.
2. Carroll T. M.: Barley stripe mosaic virus in sperm and vegetative cells of barley pollen. *Virology*, 1974, 60, 21-28.
3. Esau K.: *Viruses in plant hosts*. The University of Wisconsin Press, 1968.
4. Garbaczewska G.: Ultrastructure of potato meristem tissue under virus infection. *Ann. Med. Sect. Pol. Sci.* 1976, (w druku).
5. Golinowski W.: Badania floemu ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) roślin zdrowych i porażonych wirusem liściozwoju (Potato leaf-roll virus). *Zesz. nauk SGGW-AR* 1976, 65.
6. Loebentein G.: Inhibition, interference and acquired resistance during infection. *Principles and techniques in plant virology* edited by Kado, J. C., Agrawal, H. O.: Van Nostrand Reinhold company, New York, Uncinati, Toronto, London, Melbourne. 1972.
7. Karnoysky, M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 25, 137 A.
8. Krylova A. et al.: Potato virus X in potato apical meristem. *Acta Virol.* 1973, 17, 2, 172.
9. Kojima M. et al.: Isolation and electron microscopy of potato leaf roll virus. *Virology*, 1968, 35, 612-615.
10. Murayama D., Kojima M.: Studies on potato leaf roll virus in Japan. *Rept. Tott. Mycol. Inst.* 1973, 10, 731-748.
11. Peters D.: The purification of potato leaf roll virus from its vector *Myzus persicae*. *Virology* 1967, 31, 46-54.

12. Podbielkowska M. et al.: Morphology of protoplast as affected by an inhibition of respiration. *Protoplasm*, 1975, 83, 201-208.
13. Shih, C. Y., Rappaport, L.: Regulation of bud rest in tubers of potato *Solanum tuberosum* L VIII. Early effects of gibberelin A₃ and abscisic acid on ultrastructure. *Plant Physiol.* 1971, 48, 31-35.

Гражина Гарбачевска

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РОСТКОВ КАРТОФЕЛЯ, ПОРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ (PLRV)

Резюме

В образовательных клетках световых ростков клубней, пораженных вирусом скручивания листьев картофеля, не идентифицировано частичек вируса скручивания листьев. В частях флоэма этих растений находились частички вируса, а также наблюдались цитопатологические структуры, такие как: осмофильный материал, состоящий из фибриллов 3-4 нм в цитоплазме, плазмодесмах и порах пластинок ситовидных трубок; табулярные структуры, подобные микротубулям диаметром 20 нм, пузырьчатые и полипузырчатые тельца с содержанием материала, построенного из фибриллов, а также повышенные количества каллёза на ситовых пластинках. Установлены кристаллические системы частичек PLRV в клетке-спутнике. Они были локализованы на территории, выделенной белково-липидной оболочкой в цитоплазме. Наблюдались изменения в структуре ядрышка.

Grażyna Garbaczewska

CYTOLOGICAL STUDIES OF POTATO SPROUTS INFECTED WITH POTATO LEAF ROLL VIRUS

Summary

PLRV particles were not identified in the meristem sprouts of light bulbs infected with this virus. Virus particles and cytopathological structures were found in the phloem elements of these plants. The following cytopathological structures were observed in this tissue osmophilic material composed of fibrils (3-4 nm in diam.) which was located in the cytoplasm, as well as plasmodesmata and sieve plate pores; furthermore, there were microtubule-like structures (20 nm in diam.), vesicles and multivesicular bodies which contained fibrillar structures, and an increased amount of callose on the sieve plates. The presence of crystalline configurations of PLRV particles in an accompanying cell was demonstrated. They were situated within the cytoplasm, in an area encircled by protein-and-lipid membrane. Moreover, some changes in the nucleolus structure were observed.