

**Zmiany ultrastrukturalne i cytochemiczne w liściach pelargonii
(*Pelargonium sp.*) spowodowane żerowaniem
mszycy pelargoniowej (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.))**

JOANNA ŚLUSARCZYK

Zakład Ekologii i Ochrony Środowiska, Akademia Świętokrzyska, ul. Świętokrzyska 15,
25 406 Kielce Department of Ecology and Environmental Protection, Świętokrzyska Academy,
Świętokrzyska 15, 25 406 Kielce, Poland

**Ultrastructural and cytochemical changes in *Pelargonium* leaves due to aphid
(*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)) infestation**

(Otrzymano: 3.04.2006)

S u m m a r y

Infestation of aphid *Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.) caused increased deposition of phenolic compounds in the leaves of *Pelargonium sp.* Most deposits were located in the vacuole and in the area between the plasma membrane and cell wall, as well as some in the intercellular spaces. In cytoplasm damages were observed involving tonoplast and numerous vesicle deposits in the vicinity of the plasma membrane. Endoplasmic reticulum and myelin structures increased in number, as well as mitochondria whose cristae were longer and larger. Thus, we observed both the increase of organelle activity in such cells and the segregation of damaged areas in the form of membrane degradation.

Key words: *Pelargonium sp.*, *Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.), infestation, phenolic compounds, mesophyll cells, ultrastructure.

WSTĘP

Mszyce stanowią grupę owadów o szczególnym znaczeniu w rolnictwie ze względu na ich dużą szkodliwość bezpośrednią i pośrednią. Szkodliwość bezpośrednia związana jest z żerowaniem na roślinie żywicielskiej i uszkodzaniem tkanek roślinnych poprzez pobieranie z nich substancji odżywczych. Skutkiem ich żerowania są różnego rodzaju deformacje roślin, które zostały dokładnie opisane w wielu pracach (Sienicka, 1959; Krzywiec, 1968; Cichocka, 1984; Cichocka

i Goszczyński, 1986). Szkodliwość pośrednia wynika z przenoszenia wirusów roślin uprawnych oraz wydzielania rosy miodowej, na której mogą rozwijać się liczne gatunki grzybów powodujące choroby i w konsekwencji obniżenie plonów oraz pogorszenie ich jakości.

Mszyce żerują na różnych częściach roślin, głównie nadziemnych, choć atakują również części podziemne i zdrewniałe. Zasiedlają one roślinę w określonym stadium jej rozwoju i mogą preferować różne miejsca na roślinie w zależności od wieku, gatunku i biotypu mszycy. Na wybór miejsca żerowania wpływa zawartość związków azotowych, ciśnienie osmotyczne i zawartość wody (Cichocka i Goszczyński, 1986). Schnorbach (cyt. za Goszczyńskim i Cichocką, 1990) podzielił penetrację na trzy zachodzące na siebie fazy. Faza początkowa wykazuje stały wzrost głębokości penetracji i symetryczne rozmieszczenie populacji. W drugiej fazie, tzw. zmiennej coraz więcej mszyc nakłuwa floem i może rozpoczynać odżywianie. W tym samym czasie inne osobniki, które jeszcze nie osiągnęły floemu wyjmują sztylety i szukają lepszej drogi do niego. W fazie trzeciej, zwanej stałą, większość osobników odżywia się.

Penetracja sztyletów mszyc poprzez tkanki jest uzależniona od jakości i ilości enzymów trawiennych, które dostają się do rośliny wraz z jej słąną. Enzymy te hydrolizują blaszki środkowe, ściany komórkowe, a także całe protoplasty, dzięki czemu sztylety przenikają w głąb rośliny. Za hydrolizę blaszek środkowych odpowiedzialna jest poligalakturonaza warunkująca drogę penetracji w roślinie. Mszyce wydzielają ponadto celulazę, α -amylazę, α -glukozydazę, a także oksydazę polifenolową i peroksydazę, uczestniczące w unieszkodliwianiu roślinnych allomonów, stanowiących naturalny mechanizm zabezpieczający przed atakiem szkodników (Urbńska i Niraz, 1990). Allomony (fitoaleksyny), to niskocząsteczkowe związki chemiczne, najczęściej z grupy fenoli lub terpenoidów, a rzadziej poliacetylenów i alkaloidów. Są one syntetyzowane w odpowiedzi na atak czynnika patogenicznego i gromadzone w miejscu infekcji w stężeniach hamujących jego rozwój. W licznych pracach z tego zakresu (Grzebińska, 1973; Niraz i in. 1982; Leszczyński, 1987; Skrzypczak i Thiem, 1987; Szakiel, 1991) opisano szczegółowo biochemiczne aspekty powstawania mechanizmów odporności.

W związku ze stale utrzymującym się zagrożeniem roślin uprawnych i ozdobnych przez mszyce, wydaje się, że stosowana powszechnie chemiczna metoda ich zwalczania nie może pozostać jedynym sposobem ochrony roślin przed tymi szkodnikami. W tym względzie duże nadzieje wiąże się z hodowlą odmian odpornych. Aby rośliny odporne były bezpieczne dla człowieka istotne jest dokładne poznanie skutków żerowania tych owadów dla samej rośliny, oraz poznanie cytologiczno-biochemicznych aspektów związanych z odpornością roślin na szkodniki.

Celem niniejszej pracy było przeanalizowanie zmian, jakie zachodzą w komórkach roślinnych w miejscu żerowania mszyc na poziomie ultrastrukturalnym oraz ukazanie zmian cytochemicznych powstających w roślinie jako mechanizm obronny pod wpływem żerowania mszyc.

MATERIAŁ I METODY

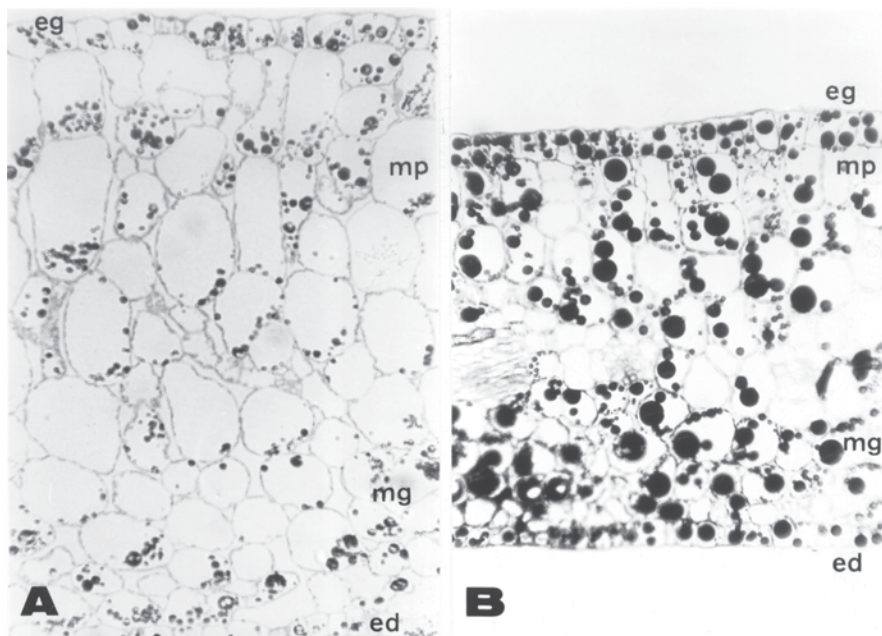
Badaniami objęto 20 roślin pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium hederifolium* hort.), rosnącej w warunkach laboratoryjnych. 10 roślin zasiedlono mszycą pelargoniową (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)), a pozostałe nie zasiedlone przez mszyce stanowiły materiał kontrolny. Po dwóch tygodniach żerowania i rozwoju kolonii mszyc, pobrano do badań mikroskopowych fragmenty liści najsilniej porażonych przez mszyce (drugi i trzeci liść od wierzchołka pędu) i odpowiednie z roślin kontrolnych. Pozostałe części tych liści posłużyły do ustalenia poziomu związków fenolowych.

Materiał kontrolny i z roślin zasiedlonych przez mszyce utrwalano w aldehydzie glutarowym z dodatkiem 1% kofeiny (wg Mueller a i Greenwood a, 1978) przez 2 godziny. Dzięki zastosowanej metodzie utrwalania możliwa była lepsza kondensacja związków fenolowych w komórkach. Następnie materiał płukano w buforze kakodylanowym, odwodniono w szeregu alkoholi i poprzez tlenek propylenu zatopiono w mieszance żywic epoksydowych (Epon/Spurr) i pozostawiono do spolimeryzowania w temp. 60°C. Poprzeczne skrawki ultracienkie (± 80 nm) krojono na ultramikrotomie LKB (Szwecja), kontrastowano w nasyconym wodnym roztworze octanu uranylu (30 min.) i cytrynianie ołowiu (30 min.) wg Reynolds a (1963). Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEOL JEM 1200 EX przy napięciu 90 kV. Elektronogramy wykonano według klasycznej metody fotograficznej używając błon negatywowych firmy Kodak.

Zawartość związków fenolowych w liściach kontrolnych i porażonych oznaczono metodą S w a i n a - Hill i s a (1959) za pomocą odczynnika Folina-Ciocalteau. Dla każdej próby wykonywano trzy pomiary. Poziom związków fenolowych odczytano z krzywej wzorcowej wykonanej dla kwasu p-hydroksycynamonowego w zakresie stężeń 50-500 μg związku w próbce.

WYNIKI

Przeprowadzone obserwacje pozwoliły stwierdzić, że mszyca pelargoniowa (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)) wkluwa się do tkanek liścia poprzez epidermę dolną. Penetracja przez epidermę polega na hydrolizowaniu od jednej do kilku komórek. Następnie mszyca hydrolizuje ściany i protoplasty komórek miękiszu, kierując koniec aparatu gębowego w okolicę wiązki przewodzącej. W komórkach liści roślin zaatakowanych przez mszyce obserwowano podwyższone ilości związków fenolowych, których lokalizacja była możliwa dzięki zastosowaniu kofeiny w procedurze utrwalania (ryc. 1 A, B). Wiele depozytów fenolowych w postaci czarnych złogów było ulokowanych w przestrzeniach między membraną plazmatyczną i ścianą komórkową, a także w przestrzeniach międzykomórkowych (ryc. 2 D i 3 E, F). Licznie występowały one także w wakuolach. Blisko dwukrotny wzrost poziomu związków fenolowych w komórkach roślin uszkodzonych przez mszyce w stosunku do roślin kontrolnych potwierdziła także analiza biochemiczna (ryc. 4).



Ryc. 1. Przekrój poprzeczny przez liść pelargonii (*Pelargonium sp.*).

A. Roślina kontrolna. Pow. 100x. (eg epiderma górna, mp miękisz palisadowy, mg miękisz gąbczasty, ed epiderma dolna).

B. Roślina porażona przez mszycę pelargoniovą (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)). Pow. 125x. Widoczny wzrost ilości związków fenolowych w roślinie porażonej w postaci czarnych kulistych struktur w komórkach (oznaczenia jak wyżej).

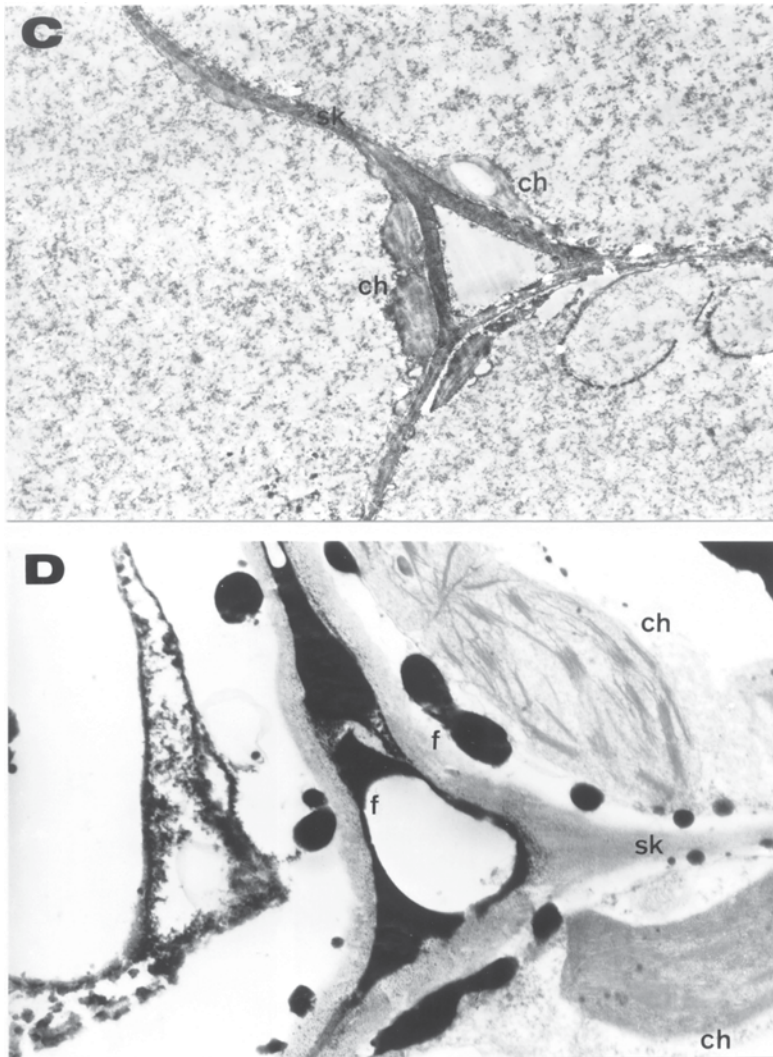
Fig. 1. Cross section of the geranium leaf (*Pelargonium sp.*).

A) from control plant. Magnification, 100x.

(eg upper epiderma, mp palisade mesophyll, mg spongy mesophyll, ed lower epiderma).

B) Plant damaged by aphids (*Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt.)). Magnification, 125x.

There is apparent increase of phenolic compounds abundance in form of dark structures in cells.



Ryc. 2. Mięszysz gąbczasty liścia rośliny kontrolnej i porażonej.

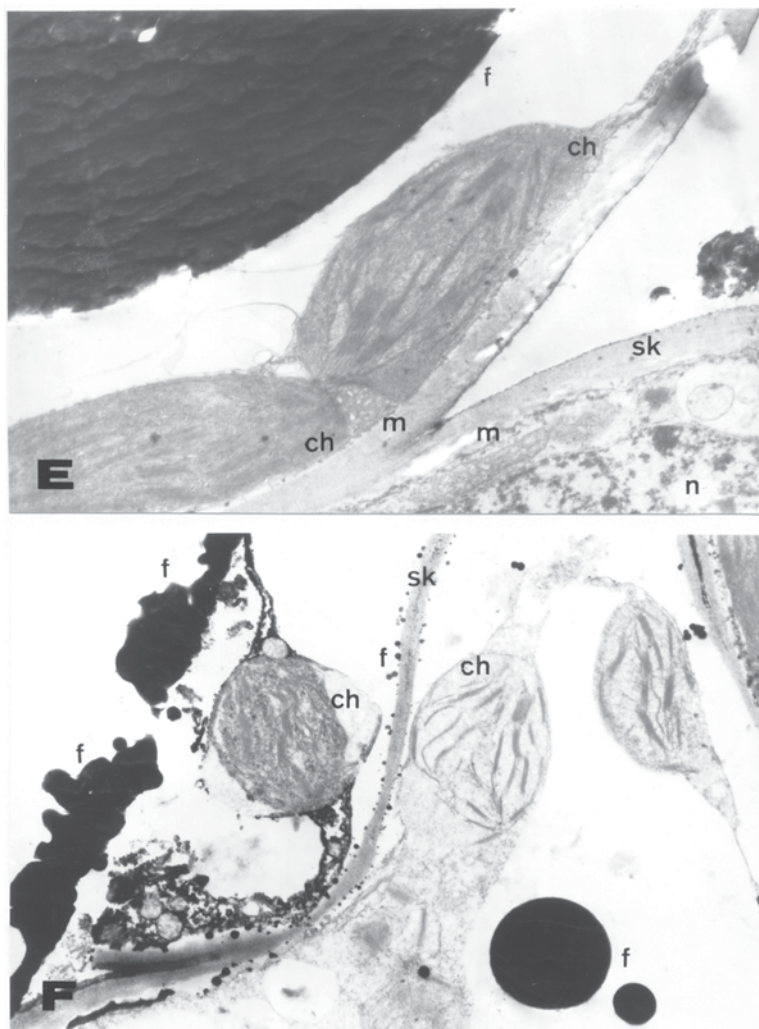
C. Brak depozytów fenolowych w przestrzeniach międzykomórkowych w mięszyszu gąbczastym liścia rośliny kontrolnej. Pow. 4000x (ch chloroplast, sk ściana komórkowa).

D. Liczne depozyty fenolowe w przestrzeni międzykomórkowej mięszyszu gąbczastego liścia rośliny porażonej. Pow. 5000x (ch chloroplast, f depozyt fenolowy, sk ściana komórkowa).

Fig. 2. Spongy mesophyll in the leaf of control plant and plant damaged by aphids.

C) Absence of phenolic deposits in intercellular spaces of spongy mesophyll in the leaf of control plant. Magn. 4000x. (ch chloroplast, sk cell wall).

D) Numerous phenolic deposits in intercellular space of spongy mesophyll in the leaf damaged by aphids. Magn. 5000x. (ch chloroplast, f phenolic deposit, sk cell wall).



Ryc. 3. Mięszysz palisadowy i gąbczasty rośliny porażonej przez mszyce.

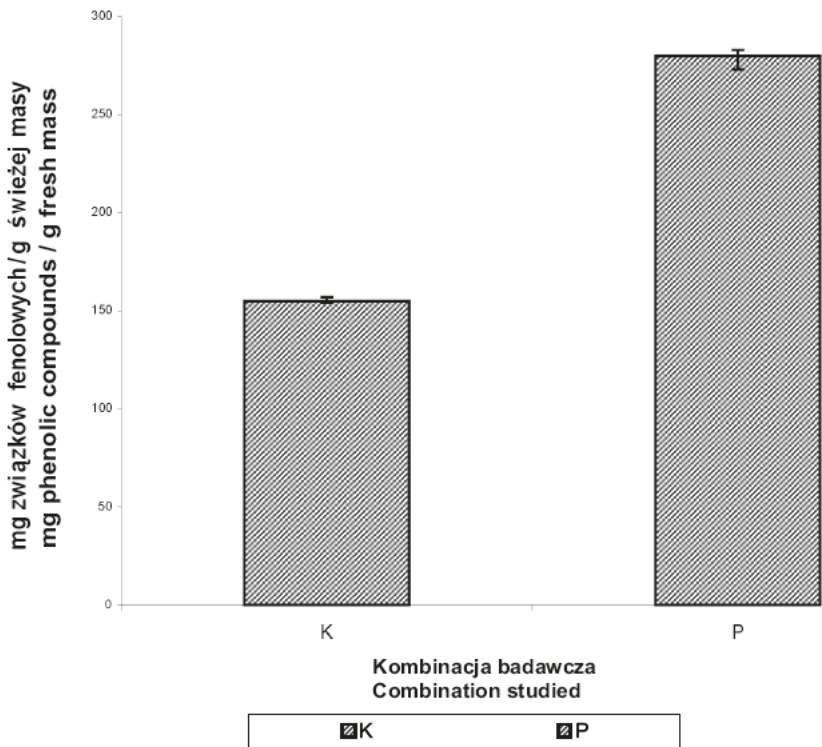
E. Fragment komórki mięszysza palisadowego rośliny porażonej z dużym złogiem fenolowym. Pow. 5000 x. (ch chloroplast, f depozyt fenolowy, m mitochondrium, n jądro komórkowe, sk ściana komórkowa).

F. Zdegradowane chloroplasty w komórce mięszysza gąbczastego oraz różnych rozmiarów złogi związków fenolowych. Pow. 4000 x. (ch chloroplast, f depozyt fenolowy, sk ściana komórkowa).

Fig. 3. Palisade and spongy mesophyll in plant damaged by aphids.

E) A part of palisade mesophyll cell in plant damaged by aphids. Note large phenolic aggregation in the cytoplasm.

F) Degraded chloroplasts and phenolic aggregations of various sizes in spongy mesophyll cell. Magn. 5000 x. (ch chloroplast, f phenolic deposit, m mitochondria, n nucleus, sk cell wall)



Ryc. 4. Zawartość związków fenolowych w roślinie kontrolnej i porażonej.

K poziom związków fenolowych roślinie kontrolnej, P poziom związków fenolowych w roślinie porażonej przez mszyce.

Fig. 4. Content of phenolic compounds in control and damaged plant.

K control plant.

P plant damaged by aphids.

Obserwacja preparatów w mikroskopie elektronowym ujawniła liczne zmiany degradacyjne w komórkach roślin zasiedlonych przez mszyce w stosunku do roślin kontrolnych (nie zasiedlonych) (ryc. 2 C). W cytoplazmie komórek mięszkowych rośliny zasiedlonej przez mszyce, obserwowano uszkodzenia w obrębie tonoplastu i liczne pęcherzykowate depozyty w pobliżu membrany plazmatycznej. W sąsiednich komórkach wzrastała ilość endoplazmatycznego retikulum i struktur myelinowych. Obserwowano też zwiększoną liczbę mitochondriów, których krysty były wydłużone i powiększone (ryc. 3 E). W bezpośrednim miejscu żerowania mszyc, w komórkach powszechnie występowały chloroplasty z wyraźnymi oznakami degradacji (ryc. 3). Destrukcji uległ układ tylakoidów oraz otoczka plastydów. W komórkach roślin zasiedlonych przez mszyce stwierdzono zarówno wzrost aktywności organelli komórkowych jak też oddzielanie się uszkodzonych przestrzeni w formie degradacji membrany cytoplazmatycznej.

DYSKUSJA

W wyniku żerowania mszyc powstają jakościowe i ilościowe straty w plonach. Stąd zagadnienia te od dawna zwracają uwagę badaczy.

Rośliny wykształciły jednak mechanizmy obrony przed szkodnikami, które mają inny charakter niż analogiczne reakcje u zwierząt i nie zapobiegają samej infekcji, mogą jednak skutecznie zahamować proces jej rozwoju. Polega on m.in. na nagromadzeniu w miejscu żerowania owadów niskocząsteczkowych związków chemicznych o szerokim spektrum działania i znacznej toksyczności wobec patogenów (Grze-lińska, 1973; N i r a z i in.1982; L e s z c z y ń s k i, 1987; S k r z y p c z a k, T h i e m, 1987; S z a k i e l, 1991; U r b a ń s k a i in. 2002). W przypadku pelargonii związki te należą głównie do grupy fenoli. Jak intensywna jest synteza tych związków wykazały obserwacje mikroskopowe i analiza biochemiczna. Obserwowany wzrost ER i liczby mitochondriów w komórkach sąsiadujących z miejscem żerowania mszyc związany jest niewątpliwie z intensywną syntezą związków fenolowych. Wysokie stężenie tych substancji w roślinie powoduje wzrost jej właściwości antybiotycznych i obniżenie jej wartości pokarmowej dla mszyc (N i r a z i in.1982; L e s z c z y ń s k i, 1987). Zniechęca to owady do żerowania na roślinie.

U wielu roślin odpowiedzią obronną jest tzw. reakcja nadwrażliwości, czyli szybkie obumieranie komórek roślinnych w miejscu infekcji patogena. Zjawisko to zapobiega rozprzestrzenianiu się infekcji w czasie potrzebnym roślinie do uruchomienia innych mechanizmów obronnych (np. syntezy allomonów) (B u j a r s k i, 1980; S z a k i e l, 1991). Być może obserwowane w miejscu żerowania mszyc zmiany degradacyjne chloroplastów, a zwłaszcza membrany plazmatycznej są oznaką takiej reakcji. Zadziałanie czynnika patogenicznego może prowadzić do wytworzenia w roślinie długotrwałej podwyższonej odporności na kolejne infekcje spowodowane przez ten sam lub inne czynniki chorobotwórcze (S k r z y p c z a k i T h i e m, 1987; S z a k i e l, 1991). Czas konieczny do powstania takiej odporności oraz okres, w którym się ona utrzymuje jest specyficzny dla danego układu patogen – roślina (G r z e l i ń s k a, 1973; S z a k i e l, 1991). Mechanizm powstawania takiej odporności nie został jednak w pełni wyjaśniony. Ponieważ roślinne allomony są związkami toksycznymi (L e s z c z y ń s k i, 1987; S z a k i e l, 1991; U r b a ń s k a i in. 2002), zapewne nie będą one również obojętne dla człowieka, stąd konieczne wydają się dalsze badania w tym zakresie na roślinach uprawnych.

LITERATURA

- Bujarski J. J., 1980. Mechanizmy odporności roślin na zakażenie wirusowe. Post. Bioch. 26: 477-497.
- Cichocka E., 1984. Cykle roczne i wpływ mszyc na rośliny żywicielskie. Rozprawy Naukowe i Monografie, SGGW AR, Warszawa, pp. 87.
- Cichocka E., Goszczyński W., 1986. Biologia odżywiania i bezpośrednia szkodliwość mszyc. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 329: 7-21.
- Goszczyński W., Cichocka E., 1990. Elektroniczny zapis żerowania mszyc. Zesz. Probl. Postep. Nauk Rol. 392: 9-19.

- Grzebińska A., 1973. Teorie mechanizmu odporności roślin na choroby infekcyjne. Post. Bioch. 19 (1): 141 158.
- Krzywiec D., 1968. Biologia mszyc. Kurs afidologii ogólnej. Warszawa, str. 53 92.
- Leszczyński B., 1987. Mechanizmy odporności pszenicy ozimej na mszycę zbożową *Sitobion avenae* F. ze szczególnym uwzględnieniem roli związków fenolowych. WSRP, Siedlce, pp. 5 97.
- Mueller W. C., Greenwood A. D., 1978. The ultrastructure of phenolic storing cells fixed with caffeine. J. Experim. Bot. 29: 757 764.
- Niraz S., Leszczyński B., Kowalski R., 1982. Analiza anatomiczna i histochemiczna lokalizacja związków fenolowych w liściach pszenicy ozimej o zróżnicowanej podatności na mszycę czeremchowo zbożową (*Rhopalosiphum padi* L.). Zesz. Nauk. Wyższej Szk. Roln. Siedlce, 1: 229 239.
- Sienicka A., 1959. Zmiany anatomiczne i cytologiczne wywołane przez *Myzus ribis* L. na liściach porzeczek (*Ribes*) i próby powiązania ich ze zbiorem owoców. Zesz. Nauk. Wyższej Szk. Rol. Szczecin, 2: 91 113.
- Skrzypczak L., Thiem B., 1987. Metabolity stresowe roślin wyższych. Wiad. Bot. 31(3): 157 166.
- Swain T., Hillis W. E., 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63 68.
- Szakiel A., 1991. Rola fitoaleksyn w naturalnej odporności roślin. Post. Bioch. 37 (2): 104 112.
- Urbańska A., Niraz S., 1990. Anatomiczne i biochemiczne aspekty żerowania mszyc zbożowych. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol. 392: 201 213.
- Urbańska A., Leszczyński B., Tjallingii W. F., Matok H., 2002. Probing behaviour and enzymatic defence of the grain aphid against cereal phenolics. Electr. J. Polish Agricul. Univ. 5, series Biology.

Streszczenie

Porażenie przez mszycę pelargonionową *Acyrtosiphon pelargonii* (Kalt) było przyczyną podwyższenia ilości związków fenolowych w liściach pelargonii bluszczolistnej (*Pelargonium hederifolium* hort.). Wiele depozytów fenolowych było ulokowane w wakuolach, w przestrzeniach między membraną plazmatyczną a ścianą komórkową, a także w przestrzeniach międzykomórkowych. Na terenie cytoplazmy obserwowano uszkodzenia w obrębie tonoplastu i liczne pęcherzykowate depozyty w pobliżu membrany plazmatycznej. Wzrastała ilość endoplazmatycznego retikulum i struktur myelinowych, a także mitochondriów, których krysty były wydłużone i powiększone. Tak, więc, w roślinach zasiedlonych przez mszyce obserwowano zarówno wzrost aktywności organelli komórkowych oraz oddzielanie się uszkodzonych przestrzeni w postaci degradacji membrany plazmatycznej.

