

BADANIA CYTOLOGICZNE LIŚCI ZIEMNIAKA PORAZONYCH WIRUSEM M ZIEMNIAKA

Anna Rudzińska-Langwald

Instytut Biologii Roślin SGGW-AR, Warszawa

Wirus M ziemniaka (potato virus M — PVM) jest wirusem nitkowatym o długości 651 nm, średnicy 12-13 nm, zaliczanym do grupy utajonej wirozy goździka [3, 9]. Badania Brandesa i wsp. [3] wykazały obecność w soku roślin zakażonych PVM cząstek wirusa o podwójnej długości, które w badanym materiale stanowiły tylko 6% mierzonych wirionów. Występowanie PVM w komórkach ziemniaka po raz pierwszy opisali Tu i Hiruki [8] w 1970 r., którzy obserwowali inkluzje wirusa zlokalizowanego przy błonach białkowo-lipidowych oraz cząstki wirusa bezładnie rozmieszczone w cytoplazmie. W przeprowadzonych obserwacjach cytologicznych tkanek miękiszu asymilacyjnego liści ziemniaków porażonych PVM zwrócono uwagę na sposób rozmieszczenia cząstek wirusa w cytoplazmie komórek porażonych roślin.

MATERIAŁ I METODY

Do badań ultrastrukturalnych pobrano fragmenty liści ziemniaków (*Solanum tuberosum* L.) odmiany Uran porażonych PVM szczep 55 oraz roślin kontrolnych. Badano komórki mezofilu roślin wyhodowanych z bulw ziemniaków porażonych PVM55 w ubiegłym roku oraz roślin inokulowanych w stadium trzech rozwiniętych liści, z których materiał pobierano po 1, 5 i 7 tygodniach od inokulacji. Rośliny wyhodowano, inokulowano i serologicznie sprawdzono na obecność wirusów ziemniaka X, S i M w Instytucie Ziemniaka w Młochowie. Skrawki liści utrwalano w mieszaninie 3% glutaraldehydu i 4% paraformaldehydu na 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,2 (wg Karnovsky'ego, 5) przez 4 godz. w temperaturze pokojowej. Stosowano dotrwalanie w 1% OsO₄

przez 2 godz. w temperaturze 4°C. Materiał odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego (10-70%), acetonu (70-100%) i tlenku propylenu, zatapiano w Eponie 812 (wg Lufta, 7). Materiał krajano na mikrotomie LKB. Barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obserwacje wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100 C.

OBSERWACJE

W komórkach roślin porażonych PVM55 obserwowano cząstki wirusa o średnicy 12-13 nm, których długość jest trudna do zmierzenia ze względu na fakt, że obserwacje prowadzono jedynie na skrawkach ultracienkich. Wykonano orientacyjnie pomiary długości cząstek w tych inkluzjach, które wydają się być przekrojone równolegle. Długość ich jest zbliżona do podawanej przez Brandesa i wsp. [3]. W inkluzjach obserwowano również cząstki krótsze i dłuższe nawet dwa razy od średniej długości cząstki podawanej przez tych autorów (651 nm). Cząstki te występowały wyłącznie w cytoplazmie. Nie zaobserwowano wirionów w jądrze, mitochondriach i chloroplastach. Jest to zgodne z tym, co opisywali Tu i Hiruki [8]. W komórkach mezofilu ziemniaka większość inkluzji wirusa grupuje się przy błonach białkowo-lipidowych, najczęściej przy tonoplaście. Sporadycznie obserwowano inkluzje przy błonach retikulum endoplazmatycznego i zewnętrznych błonach mitochondriów oraz chloroplastów. Skupienia te zwykle są mniejsze od inkluzji występujących przy tonoplaście. Na przekrojach poprzecznych przez inkluzje wirusowe wiriony często ułożone są regularnie. Każda cząstka otoczona jest przez sześć równo od niej odległych cząstek i ma środek silniej pochłaniający elektrony niż jej część zewnętrzna (ryc. 1). Środek zajmuje połowę średnicy cząstki. Nie występuje pusty, jasny na elektronogramach punkt, jak w wypadku cząstek TMV [4]. Niekiedy od ciemnego środka odchodzą przez część zewnętrzną ciemne pasma, które w inkluzjach o regularnym ułożeniu PMV łączą sąsiednie wiriony. Pasma te dzielą część korową na sześć równych części (ryc. 1).

Na przekrojach podłużnych inkluzje wirusów wyglądają jak pęczki długich nitki ustawione względem siebie równolegle. Przylegają one jednym końcem do tonoplastu i najczęściej ustawione są pod kątem prostym, bądź skośnie do powierzchni tej błony. Najdłuższe cząstki w inkluzji z ryciny 2 mają wymiary odpowiadające średniej długości cząstki PVM, natomiast cząstki wirusa z inkluzji z ryciny 3 są znacznie dłuższe. Niektóre z nich mają długość około 2×651 nm. We wczesnych stadiach porażenia inkluzje występujące przy błonach białkowo-lipidowych są jedynymi inkluzjami obserwowanymi w komórkach. Należy przypuszczać, że są one pierwotne w stosunku do skupisk wirionów nie związanych z bło-

nami. Wydaje się, że cząstki wirusa są dość ściśle połączone z błoną białkowo-lipidową. Obserwowano degenerującą komórkę, w której tonoplast na skutek procesów destrukcyjnych, uległ wpukleniu do wakuoli i rozzerwaniu (ryc. 6). Mimo znacznego przesunięcia i zmiany położenia tonoplastu (prawie o 360°), cząstki wirusa przemieszczają się razem z nim i nadal obserwuje się ich bliski kontakt.

W komórkach mezofilu roślin porażonych PVM w roku poprzednim obserwowano także inkluzje wirusa nie związane z błonami białkowo-lipidowymi. Można wyróżnić dwa rodzaje takich inkluzji. Pierwsze z nich są to skupiska równolegle ułożonych cząstek PVM. Długość takich inkluzji odpowiada średniej długości cząstki PVM. Obserwowano szeregi inkluzji ustawionych w niewielkiej odległości od siebie (ryc. 4 i 5). Drugim typem inkluzji obserwowanych w cytoplazmie podstawowej są bezładne skupiska cząstek PVM (ryc. 7 i 8). Inkluzje takie nie wykazują żadnej orientacji cząstek wirusa względem siebie i towarzyszą im zwykle zmiany w organizacji błon białkowo-lipidowych. W komórkach obserwuje się rozpad tonoplastu. Cytoplazma jest rozjaśniona z nielicznymi rybosomami (ryc. 7). Retikulum endoplazmatyczne posiada rozdęte cysterny wypełnione niekiedy ciemną treścią.

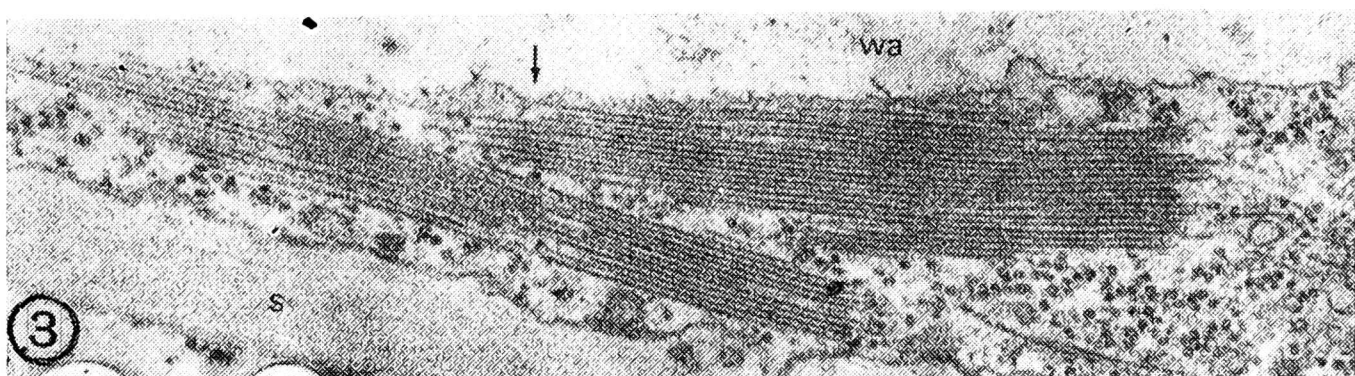
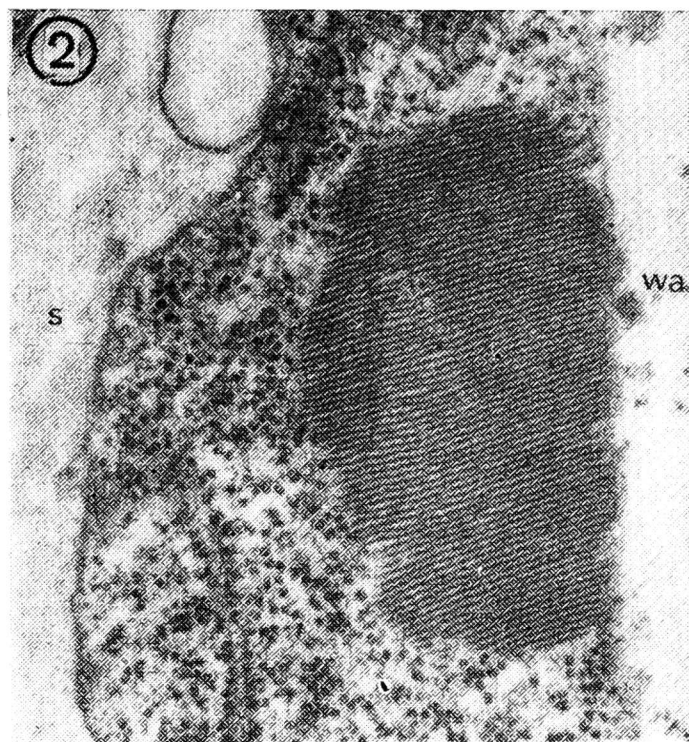
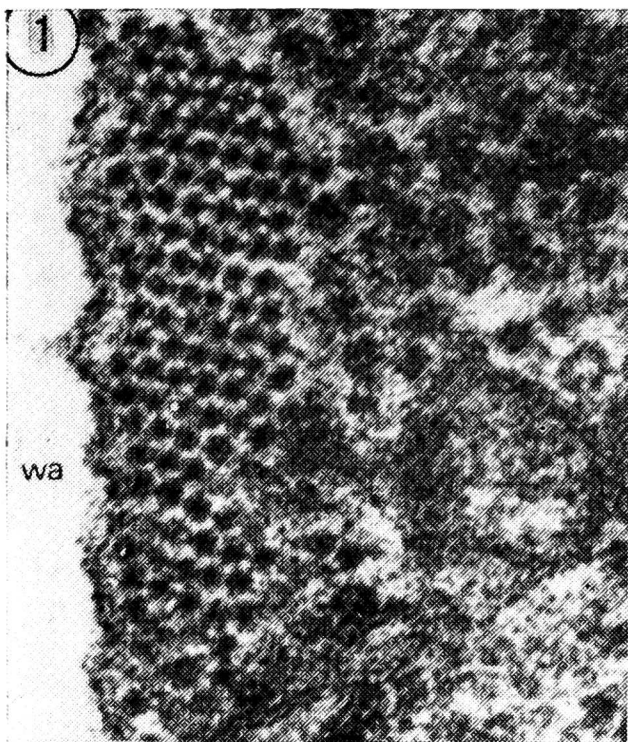
DYSKUSJA

W związku z zaobserwowanymi w komórkach ziemniaków inkluzjami nasuwa się szereg problemów. Pierwszy z nich to kolejność występowania opisanych typów inkluzji w trakcie gromadzenia się wirusów podczas przebiegu procesu chorobowego. Wydaje się, że inkluzje związane z błonami białkowo-lipidowymi komórki pojawiają się przed wystąpieniem pozostałych typów inkluzji. Po oderwaniu się inkluzji od błony występuje powolna jej degradacja do skupiska bezładnie rozrzuconych w cytoplazmie cząstek PVM. Tak więc regularne inkluzje występujące w cytoplazmie podstawowej, a nie związane z błonami białkowo-lipidowymi stanowiłyby stadium pośrednie między inkluzjami występującymi przy błonach, a inkluzjami w cytoplazmie posiadającymi nieregularny układ cząstek. Następnym problemem do dyskusji jest domniemana rola błon białkowo-lipidowych w procesie montażu cząstek wirusa oraz tworzenia inkluzji. Jeżeli rzeczywiście inkluzje powiązane z błonami białkowo-lipidowymi komórki są pierwotne w stosunku do tych w cytoplazmie, to jaką rolę grają czynniki znajdujące się w błonie, a łączące się z którymś z komponentów nukleoproteidu? Czynniki te nazywać tu będziemy receptorami błony. Prawdopodobnie formują one inkluzje, na co wskazują nie tylko obserwacje inkluzji przyłączonych do receptorów błony, ale również inkluzji znajdujących się w cytoplazmie. Nie jest możliwe przypuszczenie,

aby inkluzje takie powstały z wirionów rozproszonych bezładnie w cytoplazmie. Są one długości jednej cząstki, a więc wiriony musiałyby się ustawić dokładnie bok przy boku, co jako proces czysto fizyczny jest trudne do wyobrażenia, gdyż istniejące powinowactwo między białkami kapsydów tych wirionów jest jednakowe na całej długości cząstki. Błona byłaby tu starterem umożliwiającym ustawienie cząstek zanim połączą się między sobą w procesie tworzenia się inkluzji. Z drugiej strony można by sugerować, że powstanie agregatów ściśle powiązanych z receptorami błony ma jeszcze inne, ważniejsze znaczenie. W obrębie inkluzji połączonych z błonami białkowo-lipidowymi spotyka się cząstki o różnej długości. Do interpretacji tego faktu należy podchodzić bardzo ostrożnie, gdyż może to być wynikiem skośnego przekroju przez inkluzje. Może to jednak sugerować, że jest to zjawisko związane ze składaniem kompletnych cząstek z białek i kwasu nukleinowego. Jest to proces czysto fizyczny, zgodnie z tym, co podaje Bancroft [3]. Proces składania cząstki zaczyna się od jednego końca nici kwasu nukleinowego. Być może receptory błony grupują wokół siebie białka kapsydu wirusa, tworząc w ten sposób rodzaj tulei, w którą wchodzi nie RNA. Zostaje ona następnie obudowana przez białka. Agregacja białek trwa dalej, mimo, że skończyła się nie RNA obudowywana białkiem i w ten sposób tworzy się następna tuleja, jako miejsce uchwytu dla następnej cząsteczki kwasu nukleinowego. W ten sposób można tłumaczyć występowanie cząstek PVM dłuższych dwukrotnie niż cząstka wirusa. Przedstawiona sugestia powstawania receptorów potwierdzałaby hipotezę podawaną w literaturze, dotyczącą bliżej niesprecyzowanych receptorów komórki, czy centrów infekcji [1, 6]. Występowanie w błonach elementarnych komórki białek mających zdolność łączenia się z białkami kapsydu wirusa, warunkowałaby w tym wypadku możliwość infekowania komórek przez wirus M ziemniaka.

LITERATURA

1. Atabekov J. G.: Host specificity of plant viruses: *Ann. Rev. Phytopath.* 1975, t. 13, 127-145.
2. Bancroft J. B.: The self-assembly of spherical plant viruses: *Advances in Virus Research*. Academic Press, New York and London, 1970, 99-134.
3. Brandes J., Wetter C., Bagnall R. H., Larson R. H.: Size and shape of the particles of potato virus S, potato virus M and carnation latent virus, *Phytopathology*, 1959, t. 49, 443-446.
4. Esau K.: *Viruses in plant hosts, from distribution and patologic effects*: The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee and London 1968.
5. Karnovsky M. J.: A formaldehyde — glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy: *J. Cell. Biol.*, 1965, t. 25, 137 A.
6. Loebenstein G.: Inhibition, interference and acquired resistance during infection, w *Principles and techniques in plant virology* edited by Kado J. C., Agrawal



Ryc. 1-4. Fragmenty komórek miękiszu liści ziemniaka odmiany Uran zawierające inkluzje o regularnym ustawieniu cząstek PVM. Rośliny wyhodowane z bulw porażonych PVM

1 — Przekrój poprzeczny przez inkluzję. Widoczna struktura pojedynczej cząstki — ciemny środek i otaczająca go jaśniejsza część korowa. Pomiedzy sąsiednimi cząstkami w inkluzji widoczne ciemne pasma łączące je (200 000 ×)

2 — Przekrój podłużny przez inkluzję wirusa PVM przylegającą do tonoplastu pod kątem prostym (40 000 ×)

3 — Przekrój podłużny przez inkluzję wirusa ustawioną skośnie do tonoplastu. Widoczny kontakt cząstki wirusa z błoną — strzałką (40 000 ×)

4 — Inkluzje cząstek PVM ustawione szeregowo, nie związane z błonami białkowo-lipidowymi komórki (40 000 ×) wa — wakuola, s — ściana komórkowa

Ryc. 5 i 6: Komórki miękiszu liści ziemniaka odmiany Uran pochodzące z roślin porażonych PVM

5 — Przekrój podłużny przez dwie inkluzje ustawione szeregowo, nie związane z błonami (40 000 ×)

6 — Regenerująca komórka, w której tonoplast uległ wpukleniu do wakuoli i rozerwaniu (wa). Widoczne połączenie tej błony z cząstką wirusa (strzałka). Fragment tonoplastu połączony z cząstką został odwrócony o 360° na skutek procesów destrukcji. Na terenie cytoplazmy widoczne inkluzje wirusa przylegające do błon reticulum endoplazmatycznego — er (40 000 ×)
s — ściana komórkowa, m — mitochondrium

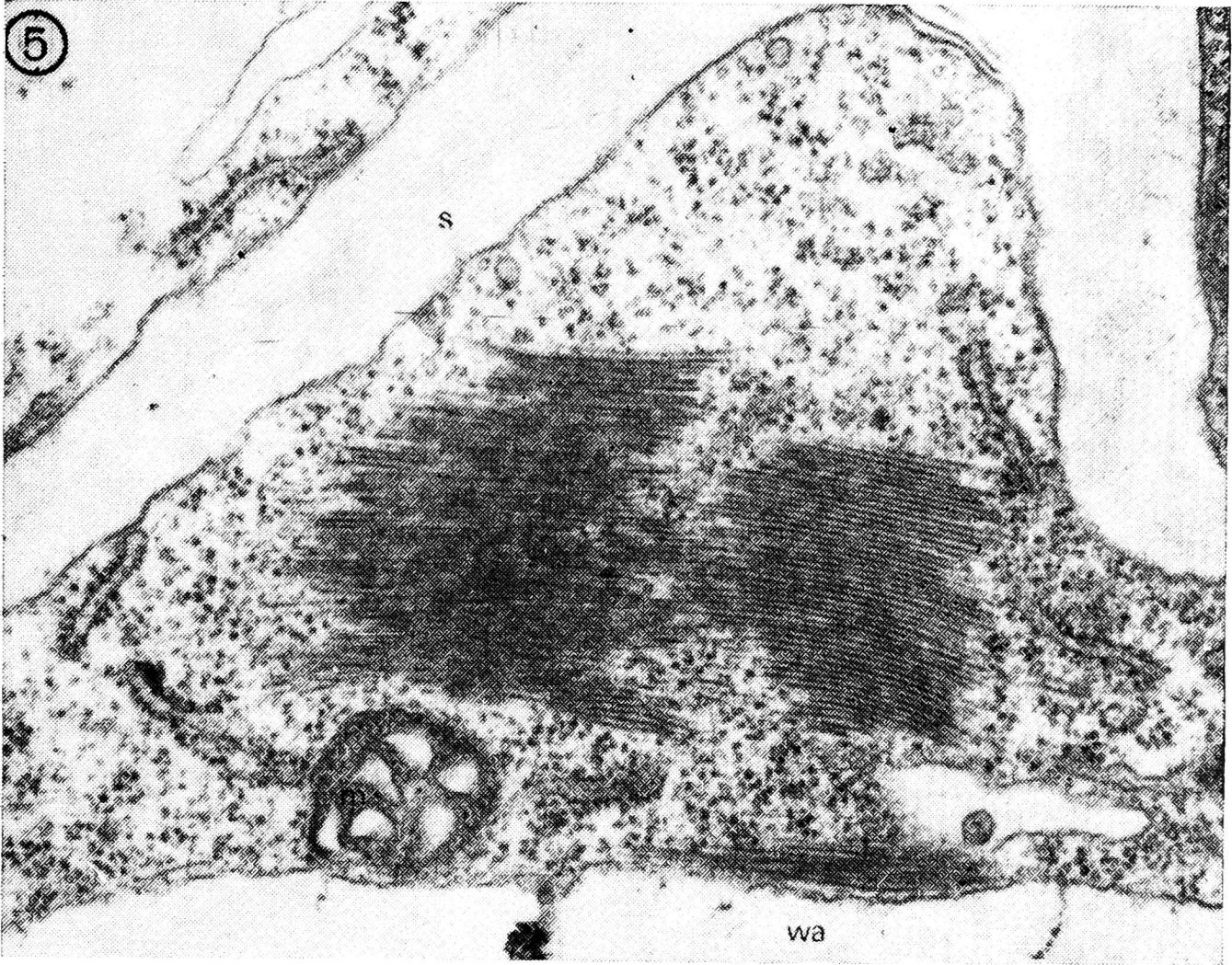
Ryc. 7 i 8. Komórki mezofilu liści roślin ziemniaka wyhodowanych z porażonych bulw, zawierające skupiska bezładnie rozrzuconych w cytoplazmie cząstek PVM

7 — Komórka zawierająca cząstki rozproszone w cytoplazmie. Niektóre z nich zgrupowane w pęczki po kilka cząstek — strzałki (40 000 ×)

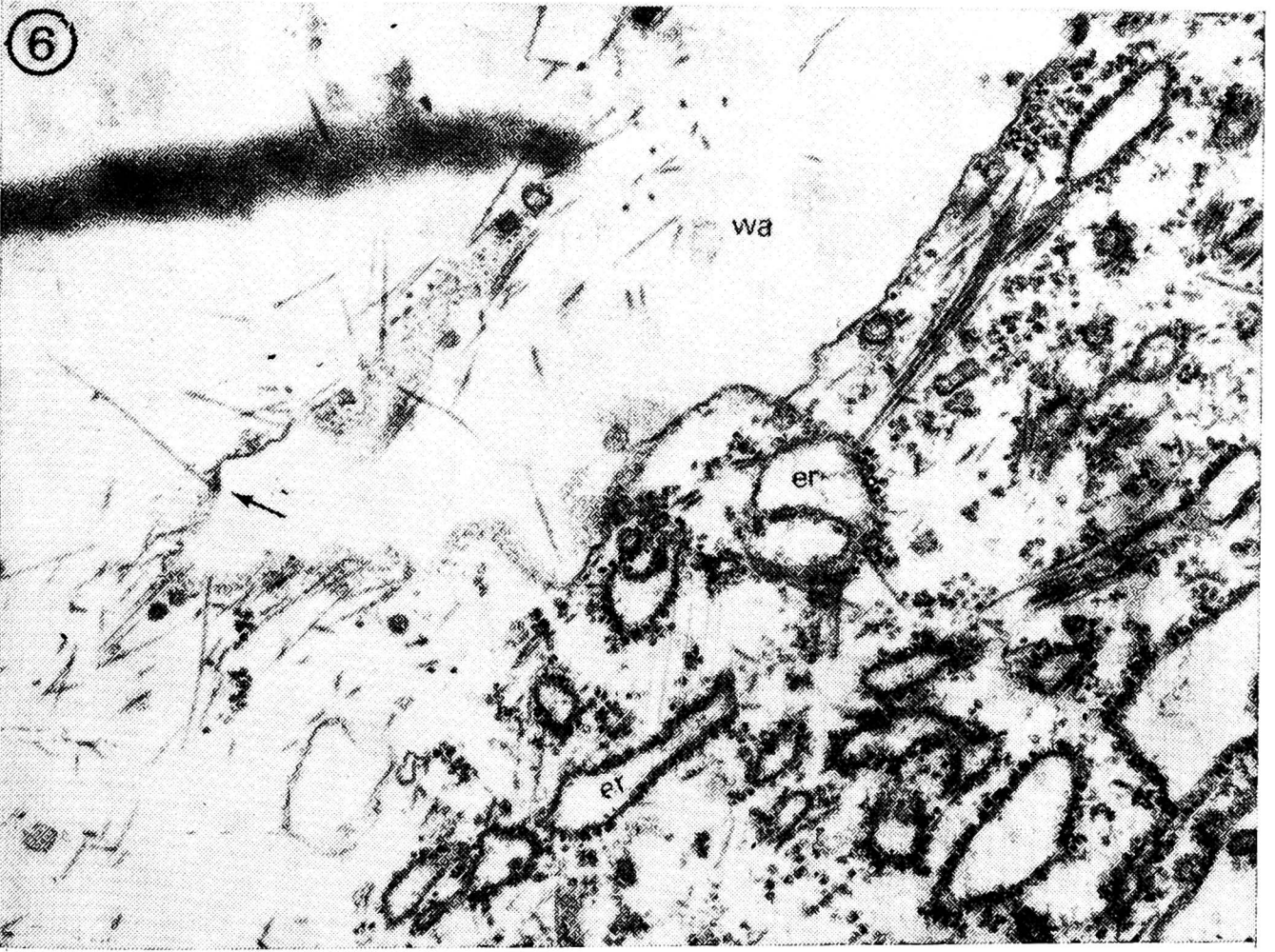
8 — Inkluzja wirusa PVM, w której nie ma żadnej orientacji cząstek względem siebie. Pojedyncza cząstka wirusa oznaczona strzałką (40 000 ×)

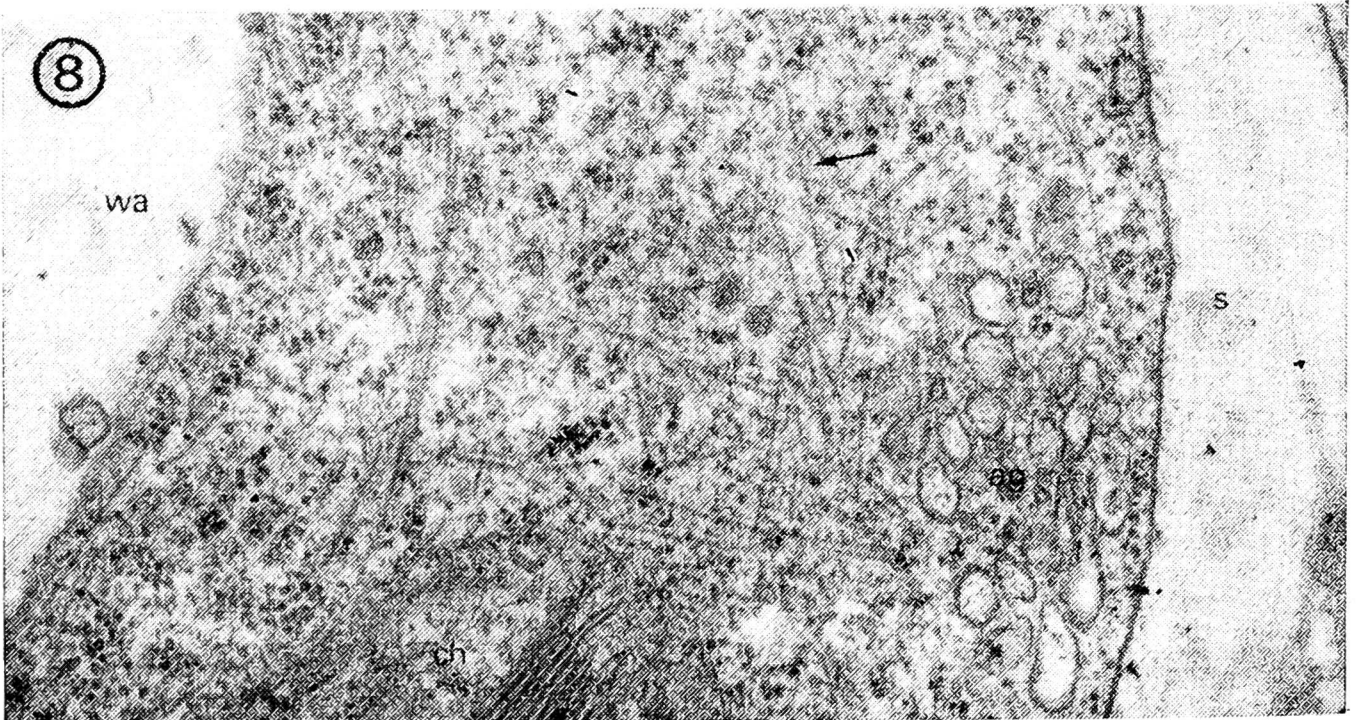
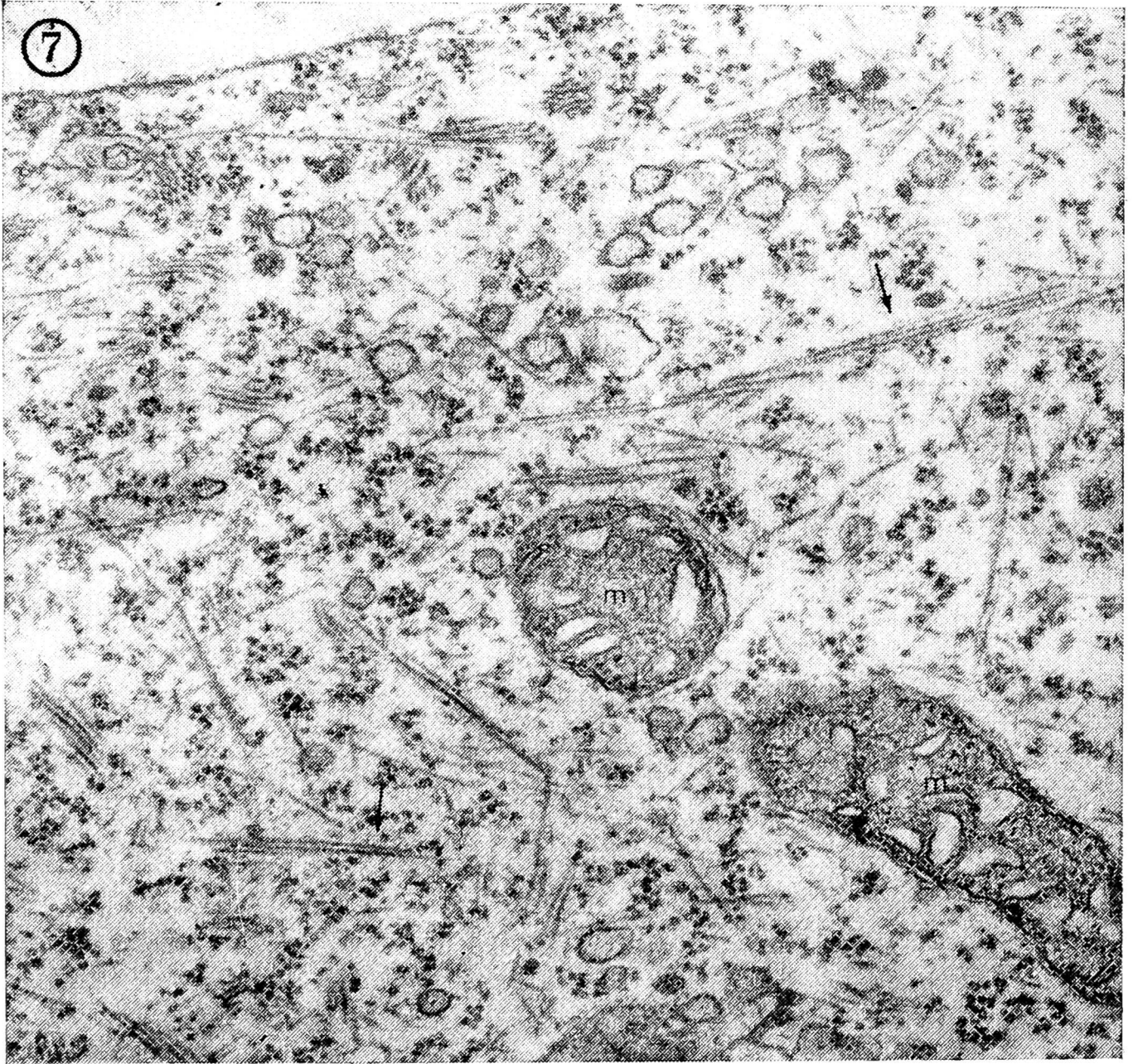
m — mitochondrium, ch — chloroplast, ag — aparat Golgi'ego, s — ściana komórkowa, wa — wakuola

5



6





- H. O.: Van Nostrand Reinhold Company, New York, Uncinnati, Toronto, London, Melbourne 1972.
7. Luft J. H.: Improvements in epony rein embedding methods: J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961, t. 9, 409.
 8. Tu J. C., Hiruki C.: Ultrastructure of potato infected with Potato Virus M. Virology 1970, t. 42, 238-242.
 9. Wetter C.: Potato Virus M: CMI/AAB Description of Plant Viruses 1972, z. 87.

— Анна Рудзиньска-Лянгвальд

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ, ПОРАЖЕННЫХ М ВИРУСОМ КАРТОФЕЛЯ

Резюме

В клетках мезофилла картофеля (*Solanum tuberosum* L.), пораженного М вирусом штамм № 55, наблюдались включения частичек вируса регулярной системы, появляющиеся при белково-липоидных оболочках, таких как: тонопласт, эндоплазматическая сеточка, а также наружные оболочки митохондрий и хлоропластов. Вирионы включений одним концом касаются поверхности оболочки, что приводит к мысли о существовании рецепторов в белково-липоидной оболочке, имеющих сродство с белками нуклеопротеида М вируса картофеля. Наблюдаемые включения М вируса картофеля не связаны с белково-липоидными оболочками и имеют более или менее нерегулярное расположение частичек. Не наблюдались частички вируса в ядре, хлоропластах и митохондриях.

Anna Rudzińska-Langwald

CYTOLOGICAL STUDIES OF PVM-INFECTED POTATO LEAVES

Summary

In the mesophyll cells of potato (*Solanum tuberosum* L.) infected with PVM, family No. 55, inclusions of virus particles of regular shape were observed.

These inclusions occur in the vicinity of protein-and-lipid membranes, e.g. the tonoplast, endoplasmatic reticulum, as well as the outer membranes of the mitochondria and chloroplasts. Inclusion virions touch the surface of the membrane with one end; this suggests that in the protein-and-lipid membrane there may be receptors with an affinity to protein of the PVM nucleoprotein. PVM inclusions unconnected with the protein-and-lipid membranes exhibit a more or less irregular particle pattern.

No virus particles were seen in the nucleus, chloroplasts and mitochondria.