

BADANIA ULTRASTRUKTURALNE ZIEMNIAKA ZAKAŻONEGO WIRUSEM LIŚCIOZWOJU

Władysław Golinowski

Instytut Biologii Roślin, SGGW — AR w Warszawie

Wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV) należy do grupy małych, polihedrycznych wirusów roślinnych o średnicy 23-25 nm [1, 5].

Wektorem wirusa liściozwoju jest mszyca brzoskwiniowa (*Myzus persicae* Sulz), która wkłuwając się do elementu sitowego liścia, wprowadza cząsteczki wirusa bezpośrednio do łyka. Choroba powodowana tym wirusem polega na zaburzeniach funkcji przewodzących łyka, czego następstwem są mniej lub bardziej licznie występujące w tej tkance nekrozy, co prowadzi w konsekwencji do znacznych strat w plonie ziemniaków.

W latach 1971-1975 przeprowadzono obszerne, anatomiczno-cytologiczne badania rozwojowe roślin zakażonych wirusem liściozwoju stosując metody mikroskopii świetlnej oraz mikroskopii elektronowej.

Badania z zastosowaniem metod mikroskopii elektronowej umożliwiły identyfikowanie cząstki wirusa w komórkach roślin zakażonych oraz dostarczyły informacji które umożliwiają bardziej szczegółowe poznanie przebiegu procesu chorobowego.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto rośliny wyhodowane ze zdrowych, bezwirusowych bulw następujących odmian: Apta, Carla, Epoka i Osa. Rośliny zakażano za pomocą mszycy brzoskwiniowej w stadium kiedy miały wykształcone pierwsze 3 liście. Prowadzono jednocześnie testy kontrolne na *Physalis floridana*, które wykazały wyraźne symptomy liściozwoju po 3 tygodniach od inokulacji. Do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano fragmenty tkanki przewodzącej liścia uwzględniając nerwy I, II, III i IV rzędu fragmenty łyka z nasady ogonka liściowego oraz z łądygi, rozgraniczając łyko zewnętrzne i wewnętrzne. Materiał pobierano w następujących odstępach czasowych po zakażeniu: 5, 13, 20, 27, 50 i 64 dni. Począwszy od drugiego ter-

minu rozpatrywano oddzielnie 3 piętra rośliny: nasada, środek i wierzchołek. Eksperyment szklarniowy przeprowadzono dwukrotnie stosując zbliżone terminy zbiorów materiału. Ponadto przeprowadzono analogiczne badania na materiałach z doświadczeń polowych. Materiał utrwalano w utrwalaczu Karnovsky'ego [2], który zawiera 4% paraformaldehyd i 3% glutaraldehyd na buforze kakodylowym przy pH 7,2 przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Materiał dotrwalano w 1% czterotlenku osmu przygotowanym na buforze kakodylowym przez 2 godziny w temperaturze 4°C. Odwadniano w narastających stężeniach alkoholu etylowego oraz w tlenku propylenu. Zatapiano w Eponie 812. Materiał krajano na ultramikrotomie LKB i kontrastowano w cytrynianie ołowiu i octanie uranylu. Obserwacje i dokumentację wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100 B.

WYNIKI I DYSKUSJA

Cząsteczki wirusa liściozwoju (PLRV) są nieco większe od rybosomów i posiadają ostrzejsze zarysy. W wyróżnicowanych elementach sitowych nie występują rybosomy, dzięki czemu łatwo jest stwierdzić obecność wirusa. W elementach tych cząsteczki wirusa występują najczęściej w przyściennej warstwie cytoplazmy, rozmieszczone pojedynczo lub w małych skupiskach i są związane z błonami endoplazmatycznego retikulum. W różnicujących się elementach sitowych, szczególnie w materiale z późniejszych terminów, cząsteczki wirusa są rozmieszczone pojedynczo lub w małych grupach pomiędzy włóknkami proteiny floemowej (P-protein) (rys. 1 i 5). W komórkach miękiszowych cząsteczki wirusa występują na terenie matriks cytoplazmatycznej (pojedynczo lub w skupiskach, niekiedy tworzą układy parakrystaliczne) oraz w powiązaniu z błonami lipoproteinowymi (rys. 1, 2, 6, 7).

W materiale zebrany po 4 i 5 dniach od inokulacji szczegółowe obserwacje przeprowadzono we wszystkich tkankach liści na których żerowały mszyce. Stwierdzono polihedryczne cząsteczki wirusa, o średnicy 23 nm w elementach sitowych, w komórkach towarzyszących, miękiszu łykowym, młodych elementach trachealnych oraz w komórkach miękiszowych tworzących pochwę wokół małych i najmniejszych nerwów liścia. Nie stwierdzono cząsteczek wirusa w komórkach mezofilu. W elementach sitowych i w komórkach towarzyszących pojawia się w pobliżu cząsteczek wirusa, prawie homogenna, osmofilna wiropłazma utworzona z fibrylli o średnicy 3-4 nm. Podobną wiropłazmę opisali Wolański i Chamber [6] w rozwoju innego wirusa (Lettuce Necrotic Yellow Virus). W materiale kontrolnym nie stwierdzono struktur podobnych do wiropłazmy. W nerwach drugiego i trzeciego rzędu liści roślin zakażanych wszystkie elementy sitowe posiadają zwiększoną ilość kalozy. Elementy funkcjonujące wyściela cienka warstwa kalozy, której grubość zwiększa się w miejscach połączeń z komórkami towarzyszącymi. Licznie występują włóknka proteiny floemowej (P-protein), których koncentracja zwiększa się w pobliżu płytki sitowej. Retikulum endoplazmatyczne zlokalizowane jest w strefie przyściennej komórki i najczęściej obłożone jest homogenną, osmofilną wiropłazmą w obrębie

której wyróżniają się cząsteczki wirusopodobne. W plazmodesmach łączących elementy sitowe z komórkami towarzyszącymi sporadycznie obserwowano cząsteczki wirusa na tle drobnoziarnistej, osmofilnej substancji wypełniającej przewód jak również tworzącej „czopy” w miejscu wejścia plazmodesmy w ścianę komórki. Substancja ta jest podobna do wiroplazmy. Niefunkcjonujące elementy sitowe zawierają dużo kalozy, która nieregularnie zwiększa grubość ścian, znacznie redukując objętość światła komórki. Plazmalemma najczęściej jest porozrywana, jej fragmenty zwijają się i widoczne są w postaci pęcherzyków nieregularnie rozmieszczonych na powierzchni ściany komórki. Światło elementu sitowego wypełniają cząsteczki wirusa i wiroplazma. Badania floemu łodygi międzywęźli położonych nad inokulowanym liściem wykazały obecność wirusa w elementach sitowych, komórkach towarzyszących i włóknach łykowych. Duże nagromadzenie cząsteczek wirusa obserwowano w komórkach towarzyszących i włóknach łykowych floemu wewnętrznego. Na rysunku 5 przedstawione są fragmenty komórki towarzyszącej oraz dwóch elementów sitowych łyka wewnętrznego. W komórce towarzyszącej (cc) widoczne jest skupienie cząsteczek wirusa (vi) w pobliżu plazmodesm stanowiących połączenie z elementem sitowym. W wyróżnionym elemencie sitowym (se_1) cząsteczki wirusa są związane z błonami retikulum endoplazmatycznego (er). W różnicującym się elemencie sitowym (se_2) cząsteczki wirusa występują zarówno pojedynczo jak i w małych skupieniach na terenie całej komórki.

Badania rozwijających się i już rozwiniętych liści położonych nad miejscem inokulacji wskazują obecność wirusa w elementach sitowych, komórkach towarzyszących i komórkach miękiszowych. Cząsteczki wirusa obserwowano najpierw w elementach sitowych, później zaś w komórkach towarzyszących i miękiszu łykowym. Oznacza to, że rozprzestrzenianie wirusa odbywa się poprzez rurki sitowe, z których lokalnie wirus wnika do komórek miękiszowych.

W roślinach zebranych po 2 tygodniach od zakażenia największe nagromadzenie wirusa stwierdzono we floemie nasady ogonka liściowego. W cytoplazmie komórek towarzyszących obserwowano regularny układ cząsteczek wirusa, których średnica przeciętnie wynosi 25 nm. Przy większych powiększeniach w kapsydzie wyróżnić można kapsomery o średnicy 3-4 nm., których układ jest luźniejszy w porównaniu z kapsydami cząsteczek występujących w elementach sitowych. W wielu cząsteczkach część centralna jest elektronoprzezierna (rys. 2). Być może cząsteczki te są pustymi kapsydami o dość luźnym ułożeniu podjednostek, co mogłoby być związane z uwalnianiem kwasu rybonukleinowego. Wydaje się, iż podjednostki te tworzą homogenną wiroplazmę, która obficie występuje na obrzeżach terytorium zajętego przez cząsteczki wirusa w miejscach tworzenia lub rozpadu kapsydów. Substancję podobną do wiroplazmy stwierdzono również w miejscach wejścia plazmodesm w ścianę komórki, gdzie tworzy ona charakterystyczne czopy (rys. 2).

W okresie pierwszych 2 tygodni procesu chorobowego obserwowano zmiany w jądrach niektórych komórek miękiszu łykowego. Obszary chromatyny zwartej, będące obszarami elektronogęstymi, grupujące się w jądrach komórek roślin kon-

trolnych przy błonie jądrowej, wyraźnie się zmniejszają. Jądra stają się jaśniejsze. Zmienia się struktura chromatyny luźnej (euchromatyny). Na terytorium jądra pojawia się materiał włóknisty. W części peryferycznej jądra stwierdza się liczne skupienia cząstek rybosomopodobnych. W wielu miejscach powiększa się przestrzeń pomiędzy dwiema błonami jądrowymi. Zewnętrzna błona wygina się do cytoplazmy, a następnie wgina się do przestrzeni perynuklearnej. W wielu preparatach widoczne są sferyczne pęcherzyki pokryte cząsteczkami rybosomopodobnymi lub wirusopodobnymi, które występują zarówno w przestrzeni perynuklearnej jak i na zewnątrz jądra (rys. 3 i 4). Podobne zmiany dotyczące błony zewnętrznej obserwowano również w chloroplastach i mitochondriach.

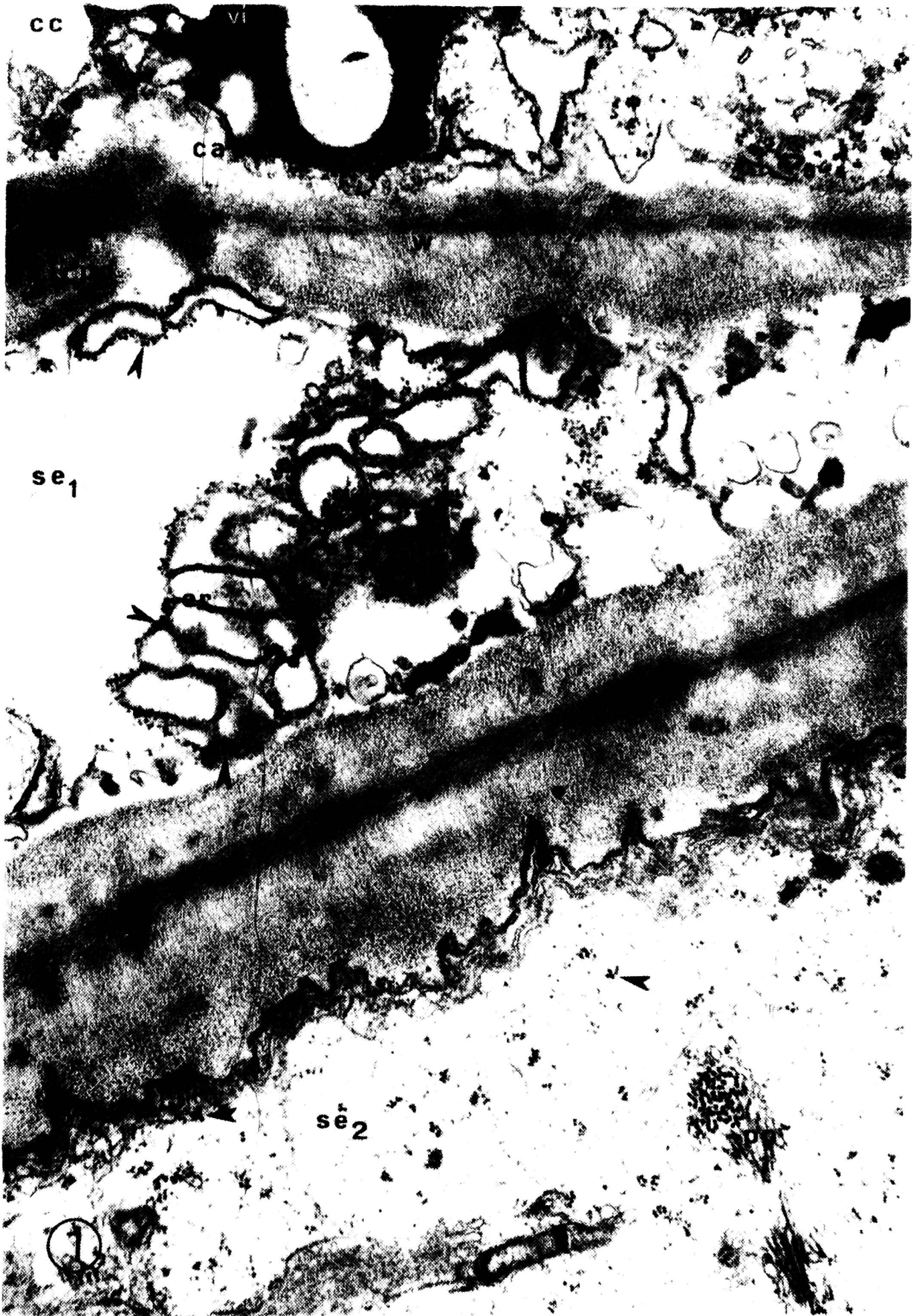
W komórkach miękiszowych floemu, szczególnie w początkowym etapie rozwoju infekcji, obserwowano zwiększoną liczbę diktiosomów, a zwłaszcza wytwarzanych przez nie pęcherzyków, struktur wielopęcherzykowatych i mikrotubul. Zwracają również uwagę inne struktury pęcherzykowate, które być może oddzielają się bezpośrednio z endoplazmatycznego retikulum. W komórkach miękiszowych łyka liczy się występują ciała paramuralne zawierające różnego rodzaju struktury włókniste wbudowywane do ściany komórkowej.

Nekrozy elementów sitowych powstają już w pierwszych dniach przebiegu infekcji, jednak liczba komórek nekrotycznych w łyku zwiększa się 2-3 razy po 2 tygodniach od inokulacji. Badając system przewodzący liścia począwszy od nerwów najmniejszych, poprzez kolejno zwiększające się typy nerwów, aż do rozbudowanego układu przewodzącego nasady ogonka liściowego, stwierdzono, że w okresie pierwszych 2 tygodni procesu chorobowego liczba komórek nekrotycznych zwiększa się proporcjonalnie do wielkości nerwu: im większy nerw tym więcej komórek nekrotycznych. W nasadzie ogonka liściowego nekrozy występują najczęściej.

W materiale z późniejszych terminów cząsteczki wirusa najliczniej występują w komórkach towarzyszących (rys. 6 i 7) i нефункционujących elementach sitowych. Duże nagromadzenie wirusa obserwowano również we włóknach łykowych zwłaszcza w okresie pierwszych czterech tygodni procesu chorobowego.

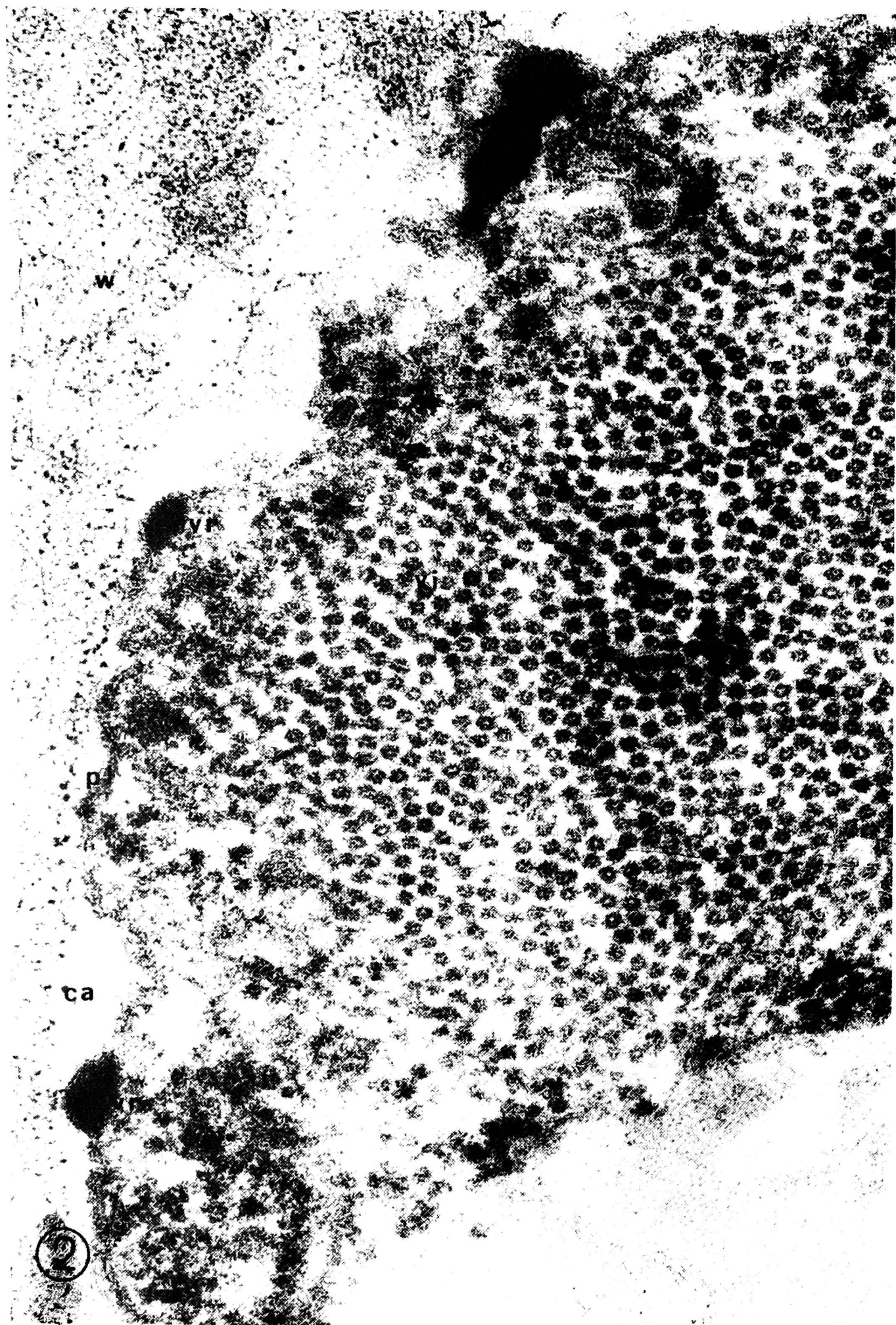
Rysunek 5 przedstawia przekrój poprzeczny dwóch sąsiadujących ze sobą elementów sitowych, będących w różnych stadiach rozwojowych. Element sitowy se_1 jest w pełni wyróżnicowany. Błony retikulum endoplazmatycznego są obłożone wiropłazmą w której wyróżniają się cząsteczki wirusa. W komórce widoczne są pęcherzyki oraz nieliczne włókna proteiny floemowej (P-protein). Element sitowy se_2 wydaje się być ontogenetycznie młodszą komórką. Zawiera znaczne ilości cząsteczek wirusa. W strefie przyściennej widoczne jest powiązanie cząsteczek wirusa z błonami elementarnymi. W dwóch miejscach cząsteczki wirusa posiadają układ krystaliczny. W strefie środkowej komórki cząsteczki wirusa rozrzucone są pojedynczo lub w małych grupach wśród włókien proteiny floemowej.

Rysunki 6 i 7 przedstawiają cząsteczki PLRV w komórkach towarzyszących ogonka liściowego, które tworzą agregacje zarówno w matriks cytoplazmatycznej jak również na powierzchni błon lipoproteinowych. W cytoplazmie widoczne są



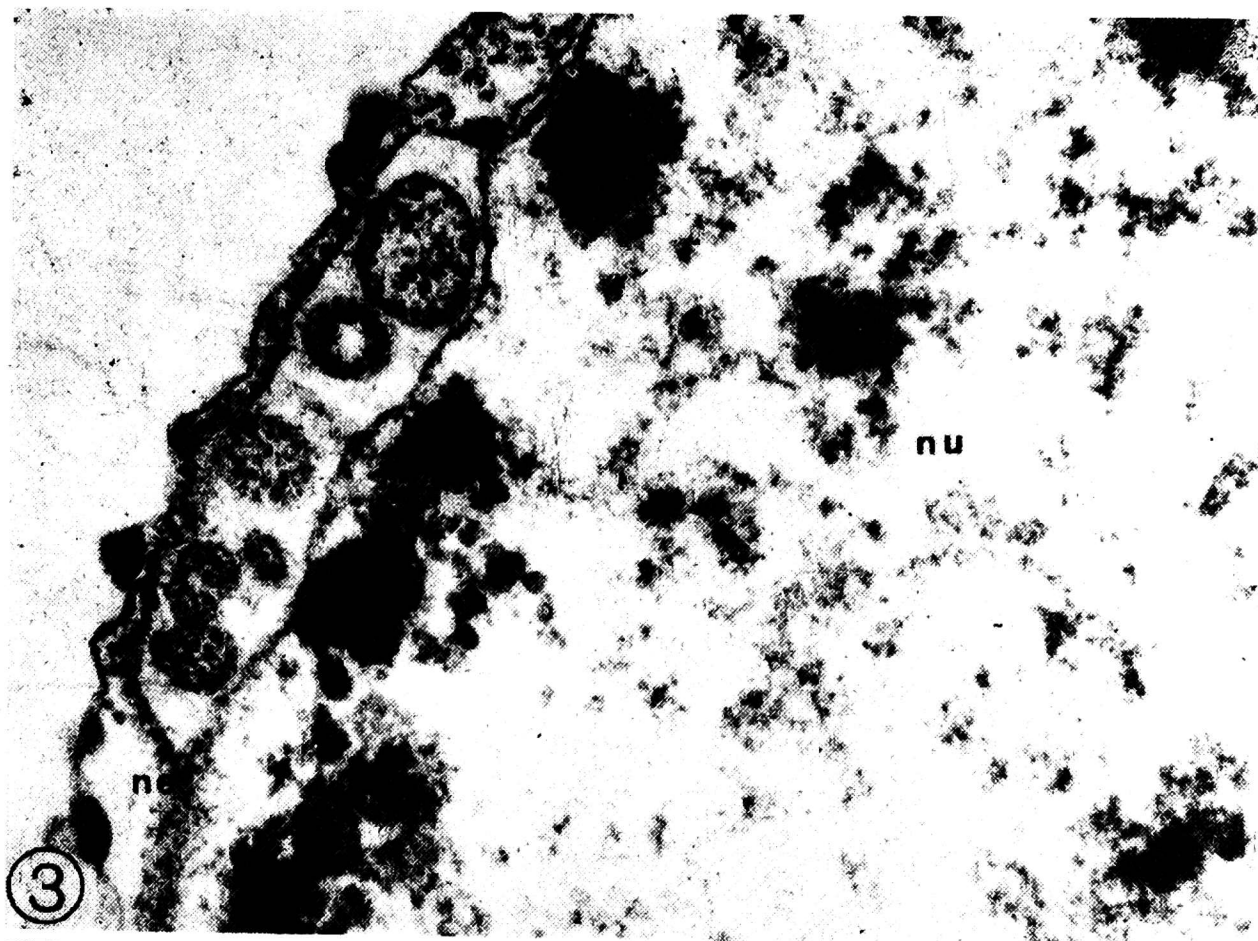
Rys. 1. Cząsteczki wirusa liściozwoju w elementach lyka wewnętrznego łodygi. Materiał zebrano po 5 dniach od zakażenia. Preparaty wykonano ze środkowej części czwartego międzywęźla, położonego nad inokulowanym liściem. Pow. 20 000 x

Fig. 1. PLRV particles in the elements of inner phloem of a stem collected five days after the inoculation. The samples were taken from the middle part of the fourth internode, located above the inoculated leaf. Magn. 20 000 x



Rys. 2. Cząsteczki wirusa w komórce towarzyszącej nasady ogonka liściowego. Materiał zebrano po 2 tygodniach od inokulacji. Pow. 100 000 x

Fig. 2. Virus particles in a companion cell of a petiole. The samples were collected two weeks after the inoculation. Magn. 100 000 x



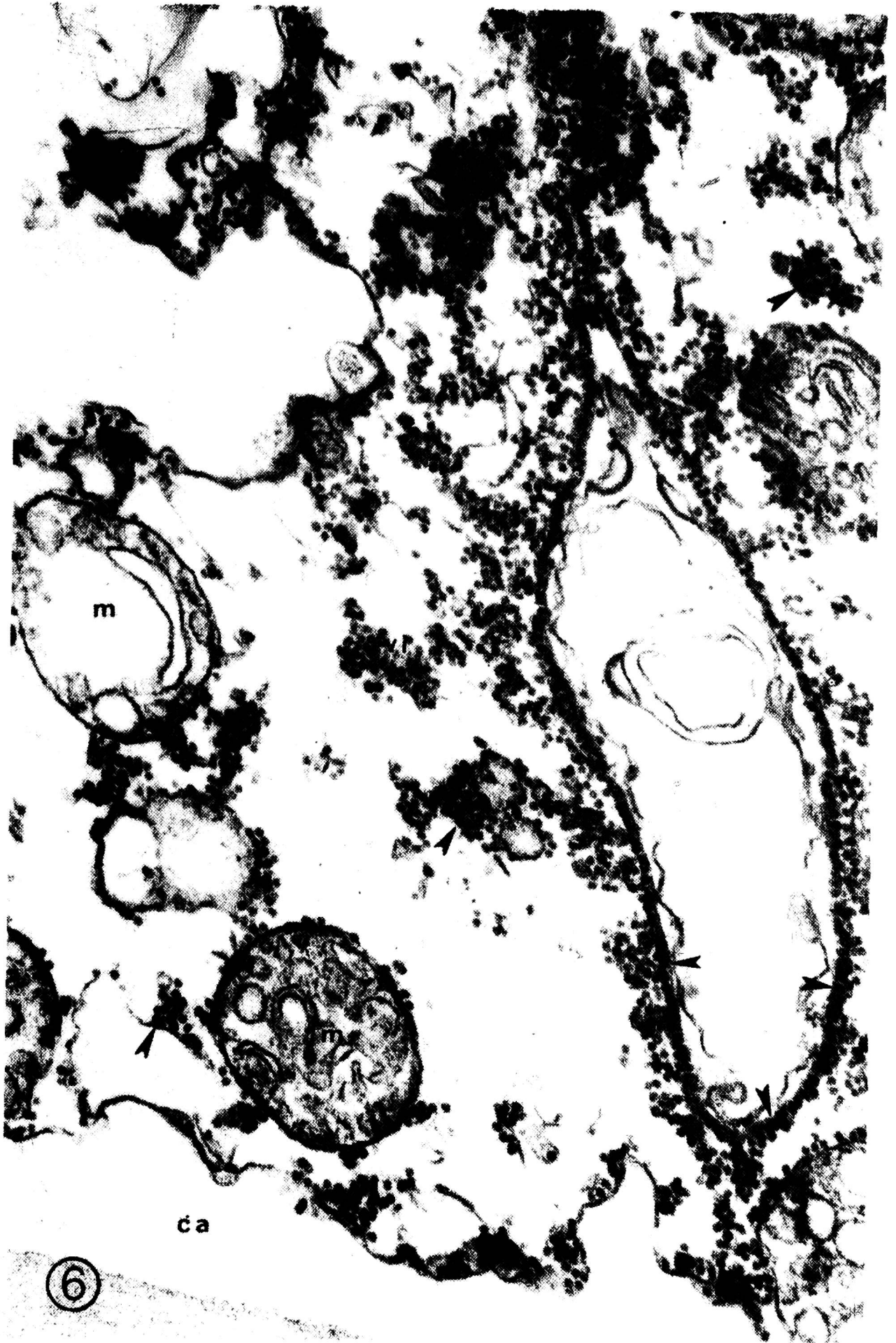
Rys. 3 i 4. Fragmenty jądra komórki towarzyszącej. Widoczne są pęcherzyki pokryte cząsteczkami wirusopodobnymi w rozszerzonej przestrzeni perynuklearnej. Materiał zebrano po 2 tygodniach od inokulacji. Pow. 50 000 x

Fig. 3 i 4. Fragments of a nucleus of the companion cell. The vesicles covered with virus-like particles in the expanded perinuclear space are visible. The samples were collected two weeks after the inoculation. Magn. 50 000 x



Rys. 5. Cząsteczki wirusa w elementach sitowych liścia. Fotografia przedstawia przekrój poprzeczny nerwu drugiego rzędu z liścia środkowej strefy łodygi. Materiał zebrano po 4 tyg. od zakażenia.
Pow. 16 000 x

Fig. 5. Virus particles in sieve elements. The photograph presents a cross section of a principle-lateral vein in a leaf of the middle part of a stem. The samples were collected four weeks after the inoculation. Magn. 16 000 x



Rys. 6. Cząsteczki wirusa w komórce towarzyszącej nerwu drugiego rzędu liścia środkowej strefy łodygi. Materiał zebrano po 4 tyg. od zakażenia. Pow. 50 000 x

Fig. 6. Virus particles in a companion cell of a principle-lateral vein in a leaf of the middle part of a stem. The samples were collected four weeks after the inoculation. Magn. 50 000 x



Rys. 7. Cząsteczki wirusa w komórce towarzyszącej nerwu drugiego rzędu liścia wierzchołkowego
Materiał zebrano 2 miesiące od zakażenia. Pow. 50 000 x

Fig. 7. Virus particles in a companion cell of a principle lateral vein in an apical leaf. The samples
were collected 2 month after the inoculation. Magn. 50 000 x

OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW (ABBREVIATIONS)

ca — kaloza (callose) cc — komórka towarzysząca (companion cell) ch — chloroplast (chloroplast)
er — retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum) m — mitochondrium (mitochondrion)
ne — błona jądrowa (nuclear envelope) nu — jądro (nucleus) o — substancja osmofilna (osmophilic
material) pd — plazmodesma (plasmodesma) pl — plazmalemma (plasmalemma) pp — proteina
łykowa (P-protein) se — element sitowy (sieve element) vi — agregacja cząsteczek wirusa (aggre-
gate of virus particles) vt — wiroplazma (viroplasm) w — ściana komórkowa (cell wall) Główki
strzałek wskazują cząsteczki wirusów (Arrowheads, virus particles)

mikrofilamenty białkowe ułożone parzyście, których średnica waha się w granicach 4-6 nm natomiast długość nie przekracza 100 nm (rys. 6). Obserwuje się degenerację wewnętrznej struktury błoniastej mitochondriów i plastydów.

W materiale z późniejszych terminów, w komórkach mezofilu nie stwierdzono cząsteczek wirusa. Chloroplasty tych komórek wypełnione są dużymi ziarnami skrobi zapasowej. System tylakoidów ulega redukcji, w preparatach najczęściej obserwowano liczne skupienia błon lipoproteinowych w strefie peryferycznej.

LITERATURA

1. Golinowski W.: Ultrastructure of potato infected with leafroll virus, *Annals Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, 1974.
2. Karnovsky M. J.: A formaldehyde — glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, *J. Cell Biol.* 27, 137A, 1965.
3. Kojima M., Shikata E., Sugawara M., Murayama D.: Isolation and electron microscopy of potato leafroll virus from plants, *Virology* 35, 612-615, 1968.
4. Peters D.: The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae*, *Virology* 31, 46-54, 1967.
5. Sarkar S., Blessing J.: DNA-like properties of the nucleic acid of potato leafroll virus, *Die Naturwissenschaften* 60, 10, 480-481, 1973.
6. Wolański B. S., Chambers T. C.: The multiplication of Lettuce Necrotic Yellow Virus, *Virology* 44, 582-591, 1971.

В. Голиновски

СВЕРХСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАРТОФЕЛЯ ЗАРАЖЁННОГО ВИРУСОМ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ

Резюме

Сверхструктурные исследования картофеля заражённого вирусом скручивания листьев раскрыли полигедрические молекулы имеющие в диаметре 23-25 нм. Находятся они в ситовых элементах, сопутствующих клетках, лубяной перенхиме, а также в различающихся лубяных волокнах в пределе всего растения. В малых и самых маленьких жилках листовой пластинки молекулы вируса обнаружили также в молодых трахеидных элементах и в паренхимных клетках тюкового влагалища.

В ситовидных элементах молекулы вируса выступают чаще всего в настенном слое цитоплазмы. Размещены они по одной или в небольших сборищах и соединены с оболочками эндоплазматического ретикулума. В перенхимных клетках молекулы вируса выступают в цитоплазматической матрице (по одной или в сборищах, иногда создают паракристаллические системы), а также в соединении с липопротеиновыми оболочками. В ситовидных элементах и в сопутствующих клетках появляется вблизи вирусных молекул почти гамогенная, осмофильная вироплазма, которая образовалась из фибриллы диаметром в 3-4 нм. Распространение вируса в растении происходит через решётчатые трубки, из которых вирус вникает в перенхимные клетки. В период 2 первых недель болезни наблю-

дали изменения в ядрах некоторых клеток лубяной перенхимы. Ядра становятся более светлыми, появляется на них волокнистое вещество, а вблизи него образуются многие сборища рибосомовидных молекул. Во многих местах увеличивается расстояние между двумя ядерными оболочками. Наружная оболочка наклоняется к цитоплазме и вгибается в пространство вокруг ядра. Во многих препаратах можно заметить пузырьки покрытые рибосомовидными или вирусовидными молекулами. Выступают они как в пространстве вокруг ядра, так и снаружи ядра. Вышеуказанные изменения позволяют полагать, что ядро принимает участие в процессе умножения вируса.

W. Golinowski

ULTRASTRUCTURE OF POTATO INFECTED WITH POTATO LEAF ROLL VIRUS

Summary

An electron microscope study of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants infected with potato leaf roll virus (PLRV) revealed the presence of isometric particles 23-25 nm in diameter, in sieve elements, in companion cells, in phloem parenchyma, as well as in young phloem fibres throughout the whole plant. In minor leaf veins the particles of PLRV were also reported in young tracheary elements as well as in parenchyma sheath cells. In sieve elements PLRV particles occur most often in a periplial layer of cytoplasm singly or in small aggregates and closely associated with endoplasmic reticulum. In parenchyma cells the PLRV particles are seen in cytoplasmic matrix (singly, in aggregates, sometimes they assume paracrystalline arrays) as well as in connection with lipoprotein membranes. In sieve elements and in companion cells, close to the virus particles, the osmophilic viroplasm made up of fibrilles 3-4 nm in diam, and almost homogeneous occurs.

The spread of the virus in the plant takes place through the sieve tubes from which the virus moves into parenchyma cells.

During the first two weeks of the infection, the changes in the nuclei of some of the parenchyma cells of phloem were observed. The nuclei become lighter, a fine fibre-like structure occurs, on the periphery of the nucleus numerous aggregates of ribosome-like particles can be seen. In many places the space between two nuclear membranes expands. The outer membrane bends into the cytoplasm and infolds into the perinuclear space. In a number of samples spherical vesicles covered with ribosome-like or virus-like particles, that occur both in the perinuclear space and outside of the nucleus, are visible. The above-mentioned changes in the nucleus suggest that the nucleus may be involved in viral multiplication.