

## ULTRASTRUKTURA *CHENOPODIUM QUINOA* PORĄŻONEGO WIRUSEM M ZIEMNIAKA

*Anna Rudzińska-Langwald*

Instytut Biologii Roślin SGGW-AR, Warszawa

Występowanie wirusa M ziemniaka w komórkach roślin stwierdzili Tu i Hiruki [12] oraz Rudzińska-Langwald [10] dla ziemniaka jako rośliny gospodarza porażonej systemicznie przez PVM oraz Tu i Hiruki [13] i Hiruki i Tu [6] dla fasoli odmiana Red Kidney będącej gospodarzem porażanych lokalnie przez ten wirus. Wirus M ziemniaka (PVM) należy do grupy wirusa utajonego goździka (grupa carlavirus [5]). Jest on wirusem nitkowatym o długości 651 nm i średnicy 12-13 nm [1]. W roślinach porażonych obserwuje się inkluzje ustawionych równolegle cząstek wirusa. Inkluzje takie znajdują się na terenie cytoplazmy przy błonach białkowo-lipidowych.

*Chenopodium quinoa* reaguje na porażenie wirusem M ziemniaka lokalnie, tzn. porażeniu ulegają tylko liście inokulowane. W 10-20 dni po inokulacji na liściach pojawiają się chlorotyczne plamki, które w miarę rozwoju choroby rozszerzają się na cały liść. W późniejszym okresie liście zasychają.

Badania niniejsze dotyczą lokalizacji cząstek PVM w komórkach miększu roślin porażonych oraz reakcji tego miększu na porażenie.

### MATERIAŁ I METODY

Do badań ultrastrukturalnych pobrano fragmenty liści *Ch. quinoa* z roślin inokulowanych PVM, szczep 55. Następnie pobrano fragmenty liści inokulowanych i nieinokulowanych z roślin porażonych PVM po 7, 14 i 21 dniach od inokulacji oraz fragmenty liści z roślin nieinokulowanych, które znajdowały się w takim samym stadium rozwoju jak rośliny zainfekowane wirusem. Rośliny porażone PVM i zdrowe otrzymano z Instytutu Ziemniaka w Młochowie. Materiał pobrano w 3 terminach: przed wystąpieniem objawów makroskopowych, w okresie wystąpienia

chlorotycznych plam i w okresie silnej chlorozy. Skrawki liści utrwalano w mieszaninie 3<sup>0</sup>/o glutaraldehydu i 4<sup>0</sup>/o paraformaldehydu na 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,2 [8] przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Stosowano dotrwalanie w 1<sup>0</sup>/o OsO<sub>4</sub> przez dwie godziny w temperaturze 4°C. Materiał odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego (10-70<sup>0</sup>/o), acetonu (70-100<sup>0</sup>/o) i tlenku propylenu oraz zatapiano w Eponie 812 [9]. Materiał krajano na mikrotomie LKB, barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Obserwacje wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100 C.

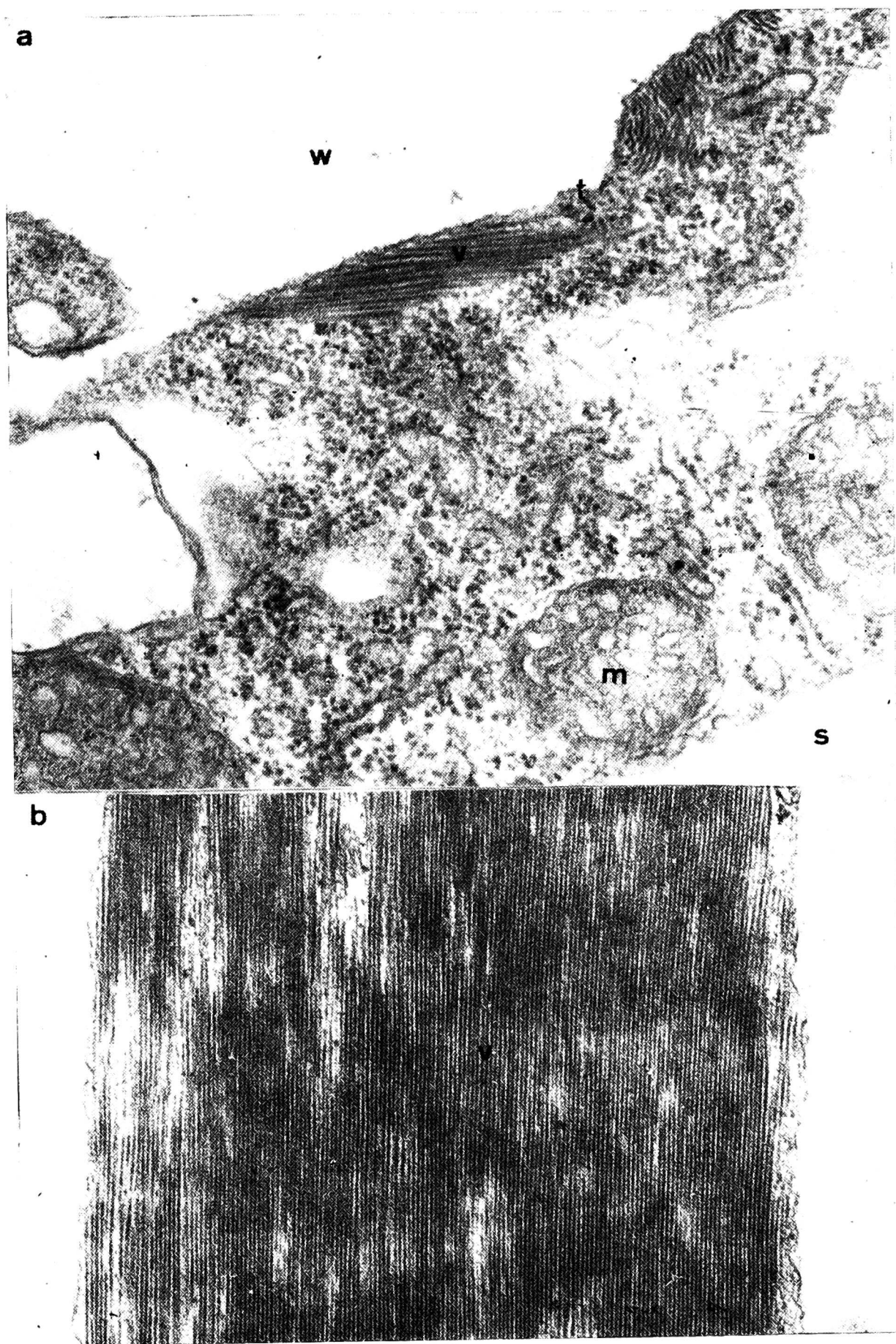
## WYNIKI

Po tygodniu od inokulacji nie zaobserwowano zmian w wyglądzie komórek miękiszu asymilacyjnego liści. Chloroplasty wyglądały normalnie i miały duże ziarna złożone z kilku do kilkunastu tylakoidów, ziarna skrobi asymilacyjnej i nieliczne ciemno wybarwione plastoglobule. Jedynie w cytoplazmie przy błonach białkowo-lipidowych wakuoli występowały niezbyt liczne inkluzje cząstek wirusa. Inkluzji takich nie obserwowano w miękiszu roślin zdrowych, ani w miękiszu liści nieinokulowanych. Cząstki w obrębie inkluzji miały układ regularny, tzn. były ustawione równolegle. Przylegały one do tonoplastu jednym końcem (ryc. 1a).

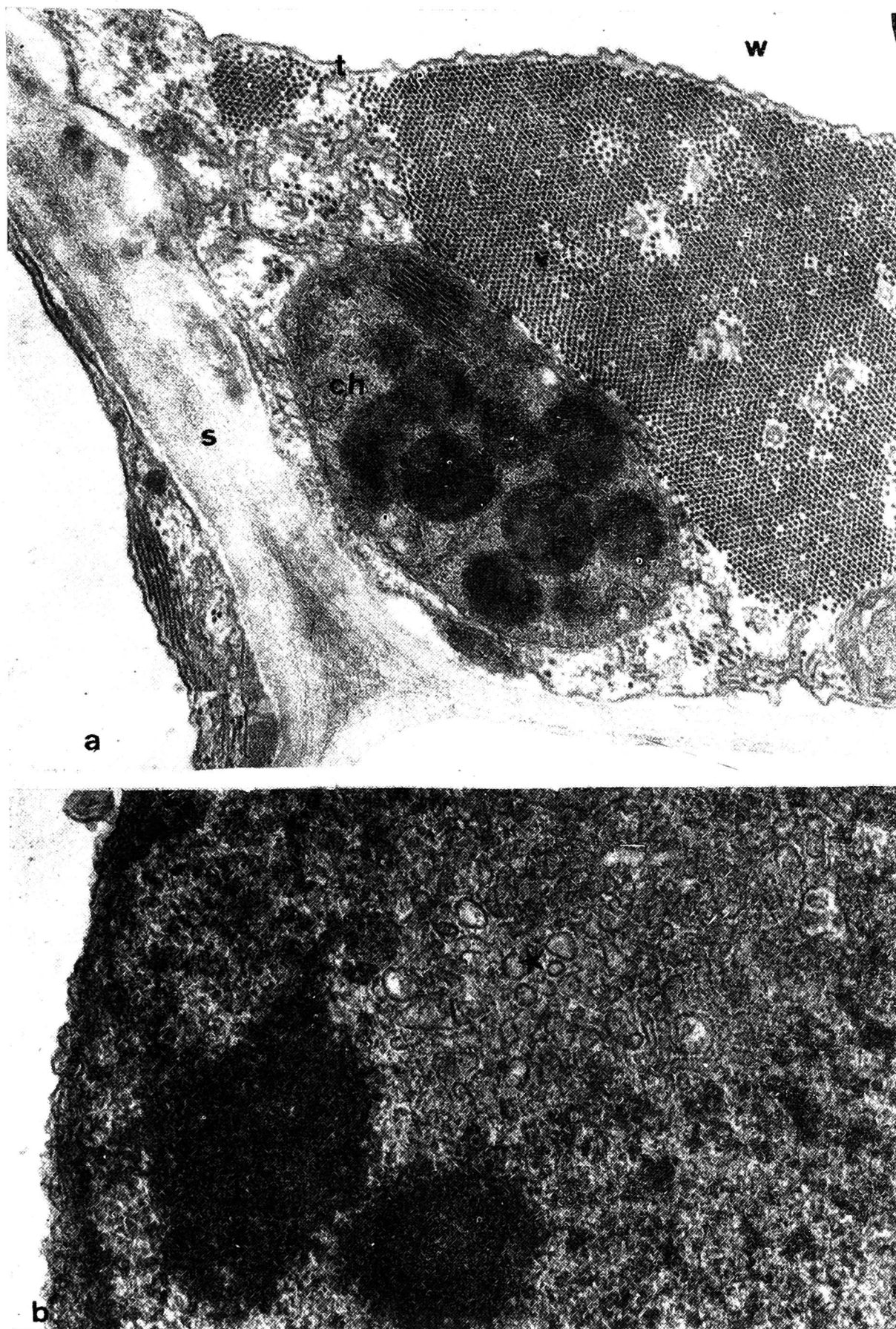
W następnych dwóch terminach (2 i 3 tygodnie od inokulacji) zmienił się obraz mikroskopowy miękiszu liści. Wytworzyły się zakłębienia ścian komórkowych do światła komórki. W cytoplazmie zwiększyła się ilość cząstek PVM (ryc. 1b). Obserwowano komórki, w których zamiast cytoplazmy występował zespół cząstek wirusa ograniczony błonami — tonoplastem i plazmolemmą. Zmniejszyła się ilość rybosomów, a występujące nie były połączone z błonami retikulum endoplazmatycznego. W cytoplazmie pojawiły się małe wakuole oraz pozwijane fragmenty błon przypominające struktury mielinowe. Zaobserwowano nieliczne globule lipidowe. Mitochondria w czasie porażenia nie ulegały zmianom i ich obraz cytologiczny był taki jak w miękiszu liści kontrolnych.

Dużym zmianom uległa struktura chloroplastów (ryc. 2a). Zanikały grana i skrobia asymilacyjna, natomiast bardzo zwiększyła się liczba i wielkość kul lipidowych występujących w stromie. Chloroplasty były mniejsze, ale cząstek wirusa w nich nie zaobserwowano. W jądrze komórkowym pojawiły się natomiast skupiska pęcherzyków i struktur wielopęcherzykowych (ryc. 2b).

W trakcie rozwoju choroby w liściach *Ch. quinoa* zaobserwowano tworzenie się nekroz. Po dwóch tygodniach od inokulacji były to tylko nekrozy pojedynczych komórek, a po trzech tygodniach nekrozy całych



Ryc. 1a. Fragment komórki miększowej liścia *Ch. quinoa* 7 dni od inokulacji PVM. Przy tonoplaście widoczne inkluzja wirusa PVM (v); m — mitochondrium, s — ściana komórkowa, t — tonoplast, w — wakuola, b. Fragment komórki miększowej liścia *C. quinoa* 21 dni od inokulacji PVM (pow. 50 tys. x)



Ryc. 2a. Fragment komórki mięsiszowej 14 dni od inokulacji PVM. Widoczna inkluzja wirusa przekrojona poprzecznie (v) i zmieniony chloroplast (ch); w — wakuola, s — ściana komórkowa, t — tonoplast

b. Fragment jądra z komórki porażonej wirusem M ziemniaka. Widoczne jąderka (j) oraz skupiska pęcherzyków i struktur wielopęcherzykowych oznaczone gwiazdką (pow. 50 tys. x)



Ryc. 3a. Nekroza komórki mięksiszowej (21 dni od inokulacji). Ściany (s) pofaldo-  
wane, treść komórki ciemna, homogenna (pow. 25 tys. x)

b. Komórka nekrotyzująca 14 dni od inokulacji widoczne masy cząstek wirusa  
(v) silnie pofalowane (pow. 50 tys. x)

c. Komórka nekrotyzująca 21 dni od inokulacji. Inkluzja wirusa przekrojona po-  
przecznie (v). Pomiedzy ścianą a nekrotyzującą cytoplazmą brak plazmolemy  
(pow. 50 tys. x)

regionów miękiszu składających się z kilku lub kilkunastu komórek. Ściany komórek nekrotycznych były silnie zakłębione i niekiedy pofałdowane (ryc. 3a). W ten sposób zmniejszyła się objętość tych komórek. Zawartość ich barwiła się bardziej intensywnie niż komórek sąsiednich. Były one wypełnione głównie przez masy cząstek wirusa silnie pofalowanych i wymieszanych (ryc. 3b). W zawartości tych komórek występowały nieliczne pęcherzyki i krople ciemno barwiących się substancji. Nie zaobserwowano natomiast żadnych struktur błoniastych. Brak było plazmolemy (ryc. 3c).

#### DYSKUSJA I WNIOSKI

Występowanie inkluzji PVM związanych z błonami białkowo-lipidowymi komórki jest charakterystyczne dla wirusa M ziemniaka [10, 12], jak również dla innych wirusów z grupy Carlavirus [2-4, 7]. Jednocześnie najwcześniejsze z obserwowanych inkluzji w komórkach *Ch. quinoa* występowały właśnie przy tonoplaście. Powiązanie cząstek wirusa z błoną wydaje się wskazywać na to, że w błonie znajdują się markery mające powinowactwo do jednego z komponentów nukleoproteidu. Domniemana rola tych „receptorów” w procesie dojrzewania inkluzji, bądź zgoła formowania cząstki wirusa oraz ich natura jest nieznana [10].

Cząstki wirusa obserwowano tylko w cytoplazmie. Zmiany w morfologii chloroplastów, polegające na redukcji systemu błoniastego były związane z makroskopowymi objawami żółknięcia liści. Przyczyny tego zjawiska w odniesieniu do roślin porażonych PVM nie są wyjaśnione. Siegel i Huber [11] stwierdzili, że RNA TMV jest komplementarne na niektórych odcinkach z DNA chloroplastów rośliny gospodarza i może blokować specyficzne funkcje tego DNA. Sugerowali oni, że wynikiem tego może być żółknięcie liści.

Następny problem dotyczy specyficznej reakcji *Ch. quinoa* jako gospodarza PVM. W badaniach niniejszych zaobserwowano szczególnie duże nagromadzenie cząstek PVM w cytoplazmie komórek miękiszu asymilacyjnego *Chenopodium*. Wynikałoby to między innymi z faktu, iż w komórkach tych wirus znajduje dogodne warunki do namnażania. Jednocześnie w końcowych etapach doświadczenia we wszystkich komórkach miękiszu inokulowanych liści, w cytoplazmie, były cząstki wirusa. Można więc sądzić, że transport czynnika infekcyjnego z komórki do komórki przebiega bez zakłóceń. Ponieważ infekcji ulegały tylko liście inokulowane należy sądzić, że upośledzeniu uległ transport przy użyciu tkanek przewodzących. W związku z tym wydaje się, że *Ch. quinoa* jest dobrym obiektem do badań zarówno nad namnażaniem się wirusa, jak i jego przemieszczaniem.

## LITERATURA

1. Brandes J., Wetter C., Bangal E. 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, s. 443-446.
2. Bos L., Rubio-Huertos: Intracellular accumulation of passiflora latent virus in *Chenopodium quinoa*. *Neth. J. Pl. Path.*, 1971, t. 77, s. 145-153.
3. Bos L., Rubio-Huertos: Light and electron microscopy of pea streak virus in crude sap and tissues of pea (*Pisum sativum*), *Neth. J. Pl. Path.*, 1972, t. 78, s. 247-257.
4. De Bok J. A., Watterreus H. A. J. I.: Electron microscopy of plant tissues infected with potato viruses A and S. *Neth. Journal Plant Path.*, 1971, t. 77, s. 106-112.
5. Harrison B. D., Finch J. T., Gibbs A. J., Hollings H., Shepherd R. J., Valentia V., Wetter C.: Sixteen groups of plant viruses. *Virology*, 1971, t. 45, s. 356-363.
6. Hiruki C., Tu J. C.: Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in red kidney bean. *Phytopathology*, 1972, t. 62, z. 1, s. 77-85.
7. Hiruki C., Shukla P.: Intracellular location of potato virus S in leaf tissue of *Chenopodium quinoa*. *Can. Journal of Bot.*, 1973, t. 51, z. 9, s. 1699-1702.
8. Karnovsky M. J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 1965, t. 25, s. 137A.
9. Luft J. H.: Improvements in epony rein embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, t. 9, s. 409.
10. Rudzińska-Langwald A.: Badania cytologiczne liści ziemniaka porażonych wirusem M ziemniaka. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, (w druku).
11. Siegel A., Hubert R.: Complementary regions to tobacco mosaic virus RNA in host DNA. *Biochem. and Biophysical Reas. Communications*, 1970, t. 4, no 2, s. 350-355.
12. Tu J. C., Hiruki C.: Ultrastructure of potato infected with potato virus M, *Virology*, 1970, t. 42, s. 238-242.
13. Tu J. C., Hiruki C.: Electron microscopy of cell wall thickening in local lesions of potato virus M infected red kidney bean. *Phytopathology*, 1971, t. 61, s. 862-868.

Анна Рудзиньска-Лянгвальд

### УЛЬТРАСТРУКТУРА *CHENOPodium QUINOA*, ПОРАЖЕННОГО M ВИРОСОМ КАРТОФЕЛЯ

#### Резюме

Проведено исследование паренхимы листьев *Chenopodium quinoa*, пораженным M вирусом. Наблюдались частицы этого вируса в зоне цитоплазмы клеток, инокулированных листьев. Количество этих частиц M вируса увеличивалось одновременно с истечением времени от инокуляции вирусом. Наблюдались изменения в морфологии хлоропластов, приводящие к редукции системы

оболочек тилакоидов и появлению большого количества пластоглобул. В зоне клеточного ядра наблюдались скопления пузырьков. В позднем периоде от времени инокуляции наблюдались некрозы клеток, содержащих включения вируса.

*Anna Rudzińska-Langwald*

## ULTRASTRUCTURE OF *CHENOPODIUM QUINOA* INFECTED WITH PVM

### Summary

Leaf parenchyma of *Chenopodium quinoa* infected with PVM was studied. Particles of the virus were present within cytoplasm of cells of the inoculated leaves. The number of virus M particles increased with the time elapsed from inoculation with this virus. Changes in the morphology of chloroplasts, consisting in the reduction of the membraneous system of tylacoids and occurrence of a large number of plastoglobules were found. Within the cell nucleus aggregations of vesicles were observed. At later periods after inoculation, necroses of cells containing virus inclusions were detected.

*Wpłynęło do Komitetu Redakcyjnego 10.01.78*