Badania cytologiczne mezofilu *Phaseolus vulgaris* L. odmiany 'Red Kidney' porażonych wirusem S ziemniaka (potato virus S-PVS)

KRYSTYNA BRZEZICKA-SZYMCZYK

Instytut Biologii Roślin SGGW-AR w Warszawie

(Przyjęto dn. 21.03.1980)

K. Brzezicka-Szymczyk (*Department of Plant Biology, Warsaw Agricultural University, Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa, Poland*) *Acta Agrobotanica* 34 (2): 209-218, 1982.

Cytological investigations of mesophyll of *Phaseolus vulgaris* L. 'Red Kidney' infected with PVS

Abstract

We have put under cytological observation 2-, 4-, and 8-day fragments of mesophyll of the leaves *Phaseolus* 'Red Kidney' infected with PVS. In the necrosis caused by PVS can be distinguished a necrotic centre, a seminecrotic zone, and a belt of terminal cells. The necrotic centre is the most changed area whose cells are most often decayed. In the seminecrotic zone, the presence of viruses in the cell causes some pathological changes. The ER canals assume the shape of swollen cisterns. The chloroplasts reacts with the softening of granas, the growth of starch granules and plastoglobules content as well as with the presence of proteinaceous fibrous structures. The karyolymph and mitochondrium matrix become elucidated. The continuity of plasmalemma and tonoplast become interrupted. Virus particles appear in the area of cytoplasm of seminecrotic zone and in the necrotic centre, they are dispersed or rarely arranged in aggregations which often are in contact with tonoplast. We have observed virus packs enclosed with lipoproteid membrane. Viruses were not stated in the terminal zone. We have ascertained the intensive development of cell walls in the cells of terminal and seminecrotic zones. A lobar or punctual way of the development appeared in different areas of the cell wall and was found independently in various cells. The modified areas included as well plasmodesmata. The above observations enable us to presume that the cells of necrotic centre and seminecrotic zone are the place of replication and assembling of viruses. The zone of terminal cells is most likely characterized by the increased immunity from multiplying viruses and is responsible for the mechanical localization of virus infection.

WSTĘP

Wirus S ziemniaka należy do grupy *Carlavirus*. Jest to wydłużona pałeczka o długości od 620 do 690 nm i średnicy od 12 do 13 nm z rybonukleinowym rdzeniem o skoku spirali równym 34° (Gibbs i Harrison, 1976). Wirus ten wywołuje na zainfekowanych liściach *Phaseolus* 'Red Kidney' lokalne objawy w postaci brunatnych, nekrotycznych plamek. Małe rozmiary nekroz charakterystyczne dla tego gospodarza pozwalają na obserwację w mikroskopie elektronowym prób obejmujących całą nekrozę. W poszczególnych strefach wyróżnionych na terenie lokalnego uszkodzenia rodzaj zachodzących zmian, a także intensywność ich wystąpienia jest różna. Obecność wirusa w komórce powoduje zmiany zarówno w protoplasście, jak i w ścianie komórkowej. Celem pracy jest przedstawienie zmian cytologicznych komórek w różnych strefach nekrozy.

MATERIAŁ I METODY

Eksperyment został przeprowadzony w warunkach szklarniowych Instytutu Ziemniaka w Młochowie.

Pierwsze liście *Phaseolus vulgaris* odm. 'Red Kidney' porażano inokulum uzyskanym z *Solanum tuberosum* odm. 'Wulkan'. Zastosowano dwukrotną, mechaniczną inokulację przy pomocy karborundu. Materiał pobierano po upływie 4, 8 i 12 dni od inokulacji. Do badań cytologicznych wykorzystywano fragmenty blaszki liściowej obejmujące nekrozę oraz tkanki otaczające. W tych samych terminach pobierano materiał kontrolny pochodzący z roślin zdrowych. Tkanki utrwalano w utrwalczu Karnovsky'ego (Karnovsky, 1965), który jest mieszaniną 3% glutaraldehydu i 4% paraformaldehydu w buforze kakodylowym o pH 7,2 przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Dodatkowo materiał utrwalano w 1% OsO_4 przez 2 godziny w temperaturze 4°C . Następnie materiał odwadniano w etanolu o rosnących stężeniach, acetonie i tlenku propylenu. Zatapiano w Eponie 812. Krojono na ultramikrotomie LKB. Barwiono cytrynianem ołowiu i octanem uranylu. Oglądano w mikroskopie świetlnym i elektronowym JEM 100 C. Makroskrawki oglądane w mikroskopie świetlnym barwiono mieszaniną błękitu metylenowego i azuru.

WYNIKI

W procesie chorobowym na inokulowanych liściach *Phaseolus* 'Red Kidney' powstawały nekrozy. Pierwsze nekrozy obserwowano już w 4 dniu po inokulacji. W wyniku namnażania i rozprzestrzeniania się wiru-

sa z komórki do komórki następowało odśrodkowe powiększanie się nekroz. W centrum znajdowały się komórki najbardziej zmienione. Stopień zmian łagodnie malał poprzez strefę otaczającą aż do zupełnego zaniku w komórkach peryferycznych. Tak więc na terenie nekrozy można wyróżnić:

1. centrum nekrotyczne,
2. strefę seminekrotyczną,
3. strefę komórek granicznych.

Czterodniowe fragmenty zainfekowanych tkanek zawierały komórki charakterystyczne dla strefy seminekrotycznej. Na liściach zebranych w ósmym dniu od inokulacji występowały w pełni uformowane nekrozy, podobnie jak i na fragmentach pobieranych po 12 dniach od inokulacji.

Ad 1. Kształty komórek znajdujących się w centrum nekrotycznym stawały się nieregularne przyjmując najczęściej zakłęsnięte zarysy. W konsekwencji komórki występujące w tej strefie traciły ze sobą łączność. Cały protoplast stanowił ciemną homogenną masę. Na tym tle dawały się zaobserwować trudne do zidentyfikowania układy błon najprawdopodobniej pochodzących ze zniszczonych tylakoidów gran. Występowały liczne, ciemne kule lipidowe. W komórkach tej strefy na skutek zmian patologicznych bardzo trudna jest identyfikacja cząstek wirusowych (Tablica I A, B, D).

Ad 2. W strefie seminekrotycznej komórki zachowywały naturalne kształty. Widoczna była także łączność międzykomórkowa. Protoplasty tych komórek ulegały daleko idącym zmianom (zwłaszcza protoplasty komórek bezpośrednio przylegających do centrum nekrotycznego) (Tablica I A, B i C).

Na terenie tych komórek zaobserwowano cząstki PVS. Wirusy występowały zawsze na terenie cytoplazmy luźno rozrzucone bądź (rzadko) w zwartych agregacjach. Skupienia nukleoproteidowych cząstek wirusowych lokowały się zwykle w pobliżu tonoplastu bądź błon otaczających chloroplast. Powinowactwo wirusa do tonoplastu było tak silne, że powstawały układy, gdzie pałeczki wirusa obydwojma końcami łączyły się z tonoplastem dwóch sąsiednich wakuol. Kontakt wirusów z plazmalemą czy innymi organellami był raczej sporadyczny (Tablica I C; III A).

Cytoplazma komórek strefy seminekrotycznej ulegała kompartmentacji. Obserwowano terytoria o gęstej cytoplazmie z dużą zawartością wolnych rybosomów, oraz elektronoprzeierne obszary, gdzie jedynym widocznym materiałem były delikatne włókienka i nieliczne rybosomy. Granularne retikulum endoplazmatyczne przybierało wygląd rozdętych cystern (Tablica II C; III D). Mimo iż w komórkach nie zauważono bezpośredniego kontaktu cząstek wirusa z mitochondrium, to obserwowano

Tablica I

A, D — Fragment miękiszu asymilacyjnego liścia *Phaseolus* 'Red Kidney' obejmujący nekrozę wywołaną przez PVS. Ciemno wybarwione komórki stanowią centrum nekrotyczne. (Makroskrawki barwiono mieszaniną błękitu metylenowego i azuru); B — Fragmenty komórek należących do różnych stref nekrotycznych. Widoczne w różnym stopniu zdegenerowane protoplasty komórek centrum nekrotycznego i strefy seminekrotycznej; C — Fragment komórki pochodzącej ze strefy seminekrotycznej. Na terenie chloroplastu widoczne lekko rozdęte tylakoidy gran i kule lipidowe. W cytoplazmie występują wirusy (V) i struktury mielinowe (gwiazdka)

Plate I

A, D — Fragments of the mesophyll of a *Phaseolus* 'Red Kidney' leaf in which necrosis caused by PVS is visible. Dark coloured cells are the necrotic center. (Macrosections were stained by a mixture of methylene-blue and azure); B — Fragments of cells from different regions of necrosis. Visible are different degrees of protoplast degeneration in the necrotic center and seminecrotic region; C — Fragment of cell from the seminecrotic region. Lipid globuls and slightly expanded thylacoid grana are visible in the chloroplast. Viruses (V) and myelin structures (asterisk) are seen in the cytoplasm

Tablica II

A-D — Fragmenty komórek strefy seminekrotycznej: A — Włókienkowe struktury białkowe towarzyszące chloroplastom (gwiazdka); B — Zmienione mitochondria o bardzo jasnej matrix i nielicznych grzebieniach; C — Rozdęte kanały ER. (Strzałka wskazuje cząstki wirusa); D — Struktury błoniaste występujące na terenie zainfekowanej komórki

Plate II

A-D — Fragments of cells from the seminecrotic regions: A — Fibrous protein structures accompanying chloroplasts; B — Changed mitochondria with very light matrix and few cristae; C — Bloated endoplasmic reticulum channels. (Arrow points to a virus particle); D — Membranous structures in the infected cell

Tablica III

A-D — Fragmenty komórek strefy seminekrotycznej: A — Agregacje wirusowe połączone z błonami plazmatycznymi; B, C — Fragmenty jąder komórkowych występujących w zainfekowanych komórkach. Widoczne rozjaśnienie karioplazmy, a także obecność pęcherzyków w pobliżu błony jądrowej (strzałka); D — Rozdęty kanał ER wypełniony włókienkowym materiałem

Plate III

A-D — Fragments of cells from the seminecrotic region: A — Aggregates of virus particles attached to plasmic membrans; B, C — Fragments of nuclei from infected cells. Lightening of the nucleoplasm and presence of granules near the nuclear membrane (arrow) are seen; D — Bloated endoplasmic reticulum channels filled with fibrous material

Tablica I—Plate I

Tablica IV—Plate IV

Tablica IV

A — Struktury tubularne gromadzone przy ścianie komórkowej w komórce pochodzącej ze strefy seminekrotycznej; B — Włókienkowy materiał wbudowany w ścianę komórkową komórki ze strefy seminekrotycznej. (Strzałka wskazuje cząstki wirusa); C, D — Aparaty Golgiego w komórkach strefy granicznej; E, F — Skupienie pęcherzyków uczestniczących w rozbudowie ściany komórkowej w strefie granicznej

Plate IV

A — Tubular structures gathered near the cell wall of a cell from the seminecrotic region; B — Fibrous material built into the cell wall of a cell from the seminecrotic region (Arrow points to virus particles); C, D — Golgi apparatus in cells from the boarder region; E, F — Granule clusters taking part in cell wall expansion in the boarder region

Tablica V

A-D — Komórki pochodzące ze strefy seminekrotycznej: A, B — Złogi ciemnego materiału wypełniające plazmodesmę i zalegające w pobliżu ścian komórkowych poza plazmolemmą; C, D — Pakiety wirusowe otoczone membraną umieszczone pomiędzy ścianą komórkową a plazmolemmą

Plate V

A-D — Show cells from the seminecrotic region: A, B — Deposits of dark material filling a plasmodesma and between the cell wall and cytoplasmic membrane; C, D — Groups of virus particles surrounded by a membrane, located between the cell wall and cytoplasmic membrane

fie seminekrotycznej gromadzone były również agregacje wirusów otoczone błoną (Tablica V B, C, D). Takie pakiety wirusów zajmowały niekiedy identyczne położenie z dwu stron plazmodesmy w przylegających do siebie komórkach. Być może złogi osmofilnego materiału stanowią kolejny etap degeneracji cząstek wirusowych wyrzuconych poza protoplast i wypełniający takie plazmodesmy.

DYSKUSJA

W zależności od rodzaju gospodarza PVS może wywoływać różne typy reakcji: lokalną, systemiczną czy też lokalno-systemiczną. Zespół objawów towarzyszący poszczególnym zależnościom jest generalnie podobny zarówno dla wirusów należących do grupy Carlavirus, jak też dla wirusów z innych grup (Allison i Shalla, 1974; Bos i Rubio-Huertos, 1971, 1972; DeBox i Waterreus, 1971; Esau, 1968; Goth i Webb, 1975; Hiruki i Tu, 1971; Hiruki i Shukla, 1973; Spencer i Kimmins, 1971; Tu i Hiruki, 1970). Przedstawiony schemat nekrozy wywołany przez PVS na *Phaseolus* 'Red Kidney' jest najbardziej zbliżony do nekroz opisanych przez Tu i Hiruki (1970) dla PVM. Allison i Shalla (1974), Faulkner i Kimmins (1975, 1978), Hiruki (1975) uznali centrum nekrotyczne za obszar najbardziej zniszczony na terenie nekrozy z silnie zmienionymi komórkami i o zupełnie obumarłych protoplastach. Strefa seminekrotyczna *Phaseolus* 'Red Kidney' obejmowała komórki z daleko posuniętą dezorganizacją protoplastu. Cytoplazma tych komórek była miejscem występowania cząstek wirusowych. Zaobserwowano częsty kontakt cząstek wirusowych z błonami otaczającymi chloroplast i z tonoplastem. Spośród licznych organelli komórkowych, reakcja chloroplastów jest najwyraźniejsza. Pęcznienie chloroplastów, wzrost na terenie ich stromy liczby ziaren skrobiowych i plastoglobul jest uważane za typowy objaw infekcji wirusowej. Gunning i Steer (1975) tłumaczą pojawienie się spiralnie zwiniętych włókienkowych struktur białkowych zawierających rybulozo-dwufosfo-karboksylazę w stromie chloroplastów jako reakcję komórki na warunki stresowe. W tym przypadku obecność tych struktur może pozostawać w ścisłym związku z wirusową infekcją i rozpadaniem się tylakoidów. Występowanie cystern i rozdętych kanałów ER jest typowym obrazem zainfekowanej komórki. Nie stwierdzono istotnego wpływu wirusa na wygląd jądra komórkowego i mitochondrium. Towarzyszące zwykle infekcji wirusowej struktury mielino- we były także obserwowane przez licznych autorów (Hiruki i Tu, 1971; Esau, 1968; Gibbs i Harrison, 1976; Mathews, 1970).

Jak dotychczas, funkcja tych struktur nie została wyjaśniona. Niezwykle istotnym dla zatrzymania infekcji wirusowej w miejscu wnikięcia patogena do rośliny jest uruchomienie przez gospodarza odpowiednich mechanizmów odpornościowych. Oprócz czynników fizjologicznych i biochemicznych hamujących proces namnażania wirusowego, być może istnieje na terenie porażonych komórek mechaniczna blokada zabezpieczająca przed rozprzestrzenieniem się wirusa w obrębie całej rośliny. Barierą jaką musi pokonać wirus bądź jego infekcyjne ss-RNA jest ściana komórkowa. Jak dotychczas nie stwierdzono swobodnego przenikania czynników infekcyjnych z komórki do komórki poprzez ścianę komórkową. Jedyną drogą, którą odbywa się międzykomórkowy transport wirusa są plazmodesmy (Schneider, 1965). Niemniej, istnieją liczne dowody wskazujące na intensywną rozbudowę ściany komórkowej oraz modyfikację naturalnych połączeń międzykomórkowych jakimi są plazmodesmy w obrębie komórek strefy granicznej i seminekrotycznej (Faulkner i Kimmins, 1978; Gill, 1973; Kim i Fulton, 1973; McMullen et al., 1977; Spencer i Kimmins, 1971; Tu i Hiruki, 1971; Wu i Dimitman, 1970). Modyfikowane powierzchnie ścian komórkowych u *Phaseolus* 'Red Kidney' obejmowały także plazmodesmy. Zaobserwowany płatowy bądź punktowy sposób rozbudowy ściany komórkowej jest prawdopodobnie związany z wielkością pola jamkowego danego fragmentu ściany komórkowej i występuje w komórkach różnych stref nekrotycznych, ale nigdy równocześnie w tej samej komórce. Depozyty włączane w ścianę komórkową posiadały zróżnicowany charakter i obejmowały struktury tubularne, włókienkowe i pęcherzykowe. Reakcje barwne wykonane przez Faulknera i Kimminsa (1975) wskazują na wzrost zawartości ligniny i kallozy w ścianie komórkowej komórek strefy seminekrotycznej i granicznej. Miejscem szczególnie intensywnego gromadzenia się kallozy były wyjścia plazmodesm ze ściany komórkowej. Allison i Shalla (1974) stwierdzili i opisali stopniowe, obustronne zatykanie takich plazmodesm kallozą. Wyłączenie z normalnej działalności plazmodesm niewątpliwie zmniejsza prawdopodobieństwo wyjścia wirusa poza nekrozę i rozprzestrzenianie się infekcji. Podobną eliminującą rolę mogą odgrywać wirusowe pakiety wyrzucane poza protoplast do przestrzeni pomiędzy plazmalemą a ścianą komórkową zaobserwowane u 'Red Kidney'. Pozbawione w ten sposób naturalnego środowiska cząstki wirusowe nie znajdują sprzyjających warunków do dalszego namnażania. Być może jest to również jeden ze sposobów samoobronnych komórki.

Obecność cząstek wirusowych na terenie centrum nekrotycznego i w strefie seminekrotycznej wskazuje iż ma tam miejsce cały cykl życiowy

wirusa obejmujący replikację i montaż. Brak wirusów w strefie granicznej pozwala przypuszczać, że jest to obszar o podwyższonej odporności na procesy związane z namnażaniem wirusa. Intensywna rozbudowa ściany komórkowej komórek tej strefy ostatecznie może prowadzić do wytworzenia bariery mechanicznej dla rozprzestrzenienia się wirusa i zlokalizowania infekcji.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono obserwacje 2-, 4- i 8-dniowych fragmentów miękiszu asymilacyjnego liści *Phaseolus* 'Red Kidney' zainfekowanego PVS. W nekrozach wywołanych przez PVS można wyróżnić centrum nekrotyczne, strefę seminekrotyczną oraz pas komórek granicznych. Centrum nekrotyczne jest obszarem najbardziej zmienionym o komórkach najczęściej obumarłych. W strefie seminekrotycznej obecność wirusa w komórce pociąga za sobą określone zmiany patologiczne. ER przyjmuje wygląd rozdętych cystern. Chloroplasty reagują rozpulchnieniem gran, zwiększeniem liczby ziaren skrobiowych i plastoglobul, a także pojawieniem się białkowych struktur włóknistych. Wyjaśnieniu ulega kariolimfa i matrix mitochondriów. Ciągłość plazmalemy i tonoplastu zostaje przerywana. Częstki wirusa występują na terenie cytoplazmy komórek strefy seminekrotycznej i w centrum nekrotycznym luźno rozrzucone bądź (rzadziej) ułożone w agregacje często kontaktujące się z tonoplastem. Obserwowano w przestrzeniach pomiędzy plazmalemą a ścianą komórkową wirusowe pakiety otoczone błoną lipoproteidową. W strefie granicznej nie stwierdzono wirusów. W komórkach tej strefy, a także w strefie seminekrotycznej zaobserwowano wzmożoną rozbudowę ścian komórkowych. Płatowy bądź punktowy sposób rozbudowy obejmował różne powierzchnie ściany komórkowej i występował niezależnie w różnych komórkach. Obszary modyfikowane obejmowały także plazmodesmy.

Powyższe obserwacje pozwalają przypuszczać, iż komórki centrum nekrotycznego i strefy seminekrotycznej są miejscem replikacji i montażu wirusów. Strefa komórek granicznych najprawdopodobniej charakteryzuje się podwyższoną odpornością na namnażanie wirusów i jest odpowiedzialna za mechaniczną lokalizację wirusowej infekcji.

REFERENCES

- Allison A. U., Shalla T. A., 1974. The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. *Phytopath.* 64: 784-795.
- Bos L., Rubio-Huertos M., 1971. Intracellular accumulation of *Passiflora* latent virus in *Chenopodium quinoa*. *Neth. J. Plant Path.* 77: 145-153.
- Bos L., Rubio-Huertos M., 1972. Light and electron microscopy of pea streak virus in crude sap and tissues of pea (*Pisum sativum*). *Neth. J. Plant Path.* 78: 247-257.
- DeBox J. A., Waterreus H. A. J. I., 1971. Electron microscopy of plant tissues infected with potato viruses A and S. *Neth. J. Plant Path.* 77: 196-112.
- Esau K., 1968. *Viruses in Plant Hosts*. The University of Wisconsin Press. Madison Milwaukee and London.

- Faulkner G., Kimmins W. C., 1975. Staining reactions of the tissue bordering lesions induced by wounding tobacco mosaic virus and Tobacco necrosis virus in bean. *Phytopath.* 65: 1396-1400.
- Faulkner G., Kimmins W. C., 1978. Fine structure of tissue bordering lesions induced by wounding and virus infection. *Canad. J. Bot.* 56: 2990-2999.
- Gibbs A., Harrison B., 1976. *Plant Virology*. Edward Arnold-Publishers Ltd. London: 9-17.
- Gill C. C., 1973. Inclusions and wall deposits in cells of plants infected with oat necrotic mottle virus. *Can. J. Bot.* 52: 621-626.
- Goth R. W., Webb R. E., 1975. Lack of potato virus S transmission via true seed in *Solanum tuberosum*. *Phytopath.* 65: 1347-1349.
- Gunning B. E. S., Steer M. W., 1975. *Ultrastructure and the biology of plant cells*. Edward Arnold-Publishers. London.
- Hiruki C., Tu J. C., 1971. Light and electron microscopy of potato virus M lesions and marginal tissue in red kidney bean. *Phytopath.* 62: 77-85.
- Hiruki C., Shukla P., 1973. Intracellular location of potato virus S in leaf of *Chenopodium quinoa*. *Can. J. Bot.* 51: 1699-1702.
- Hiruki C., 1975. Factors affecting bioassay of potato virus S in *Chenopodium quinoa*. *Phytopath.* 65: 1288-1292.
- Karnovsky M. J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Jour. Cell Biol.* 25, 137 A.
- Kim K. S., Fulton J. P., 1973. Plant virus induced cell wall overgrowth and associated membrane elaboration. *J. Ultrastruct. Res.* 45: 328-342.
- Mathews R. E. F., 1970. *Plant virology*. New York and London Academic Press.
- McMullen C. R., Gardner W. S., Myers G. A., 1977. Ultrastructure of cell wall thickenings and paramular bodies induced by barley stripe mosaic viruses. *Phytopath.* 67: 462-467.
- Schneider I. R., 1965. Introduction, translocation and distribution of viruses in plants. *Advances Vir. Res.* 11: 163-221.
- Spencer D. F., Kimmins W. C., 1971. Ultrastructure of tobacco mosaic virus lesions and surrounding tissue in *Phaseolus vulgaris* L. var. *pinto*. *Can. J. Bot.* 49: 417-421.
- Tu I. C., Hiruki C., 1970. Ultrastructure of potato infected with potato virus M. *Virology* 42: 238-240.
- Tu I. C., Hiruki C., 1971. Electron microscopy of cell wall thickening infected 'Red Kidney' Bean. *Phytopath.* 61: 862-868.
- Wu J. H., Dimitman J. E., 1970. Leaf structure and callose formation as determinants of TMV movement in bean leaves as revealed by UV irradiation studies. *Virology* 40: 820-827.