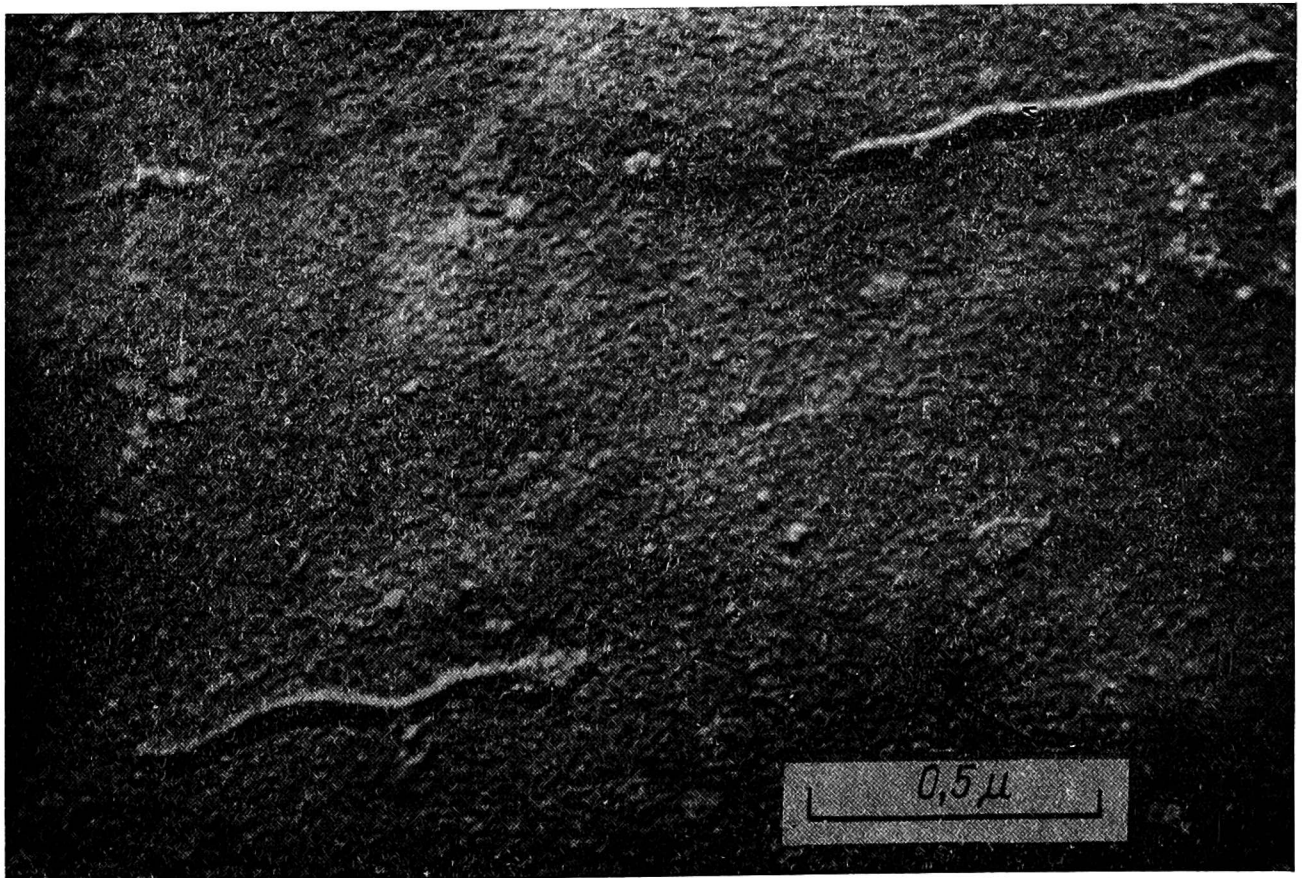


INKLUZJE WIRUSOWE W LIŚCIACH BURAKA CUKROWEGO
PORĄŻONYCH WIRUSEM
MOZAIKI BURAKA (*BETA VIRUS 2*, SMITH).
STUDIA ELEKTRONO-MIKROSKOPOWE

Tadeusz Grela, Lidia Dunajska

Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Wyniki przedstawionych badań są wycinkiem pracy podjętej nad ustaleniem zmian w ultrastrukturze komórek buraka cukrowego porażonego przez wirus mozaiki buraka. Czynnikiem chorobotwórczym mozaiki buraka jest nitkowaty wirus (rys. 1) o wymiarach 730×15 nm, [12, 13]. Wywołane przez wirus zmiany anatomiczne i cytologiczne były badane w



Rys. 1. Oczyszczony wirus mozaiki buraka. Metoda cieniowania,

komórkach buraka cukrowego w mikroskopie świetlnym przez Esau [4]. Z badań w mikroskopie elektronowym ukazała się ostatnio jedynie jedna praca Hoeferta [5]. Nasze badania są więc kontynuacją prac podjętych w ostatnich kilku latach przez wielu autorów w zakresie zmian w ultrastrukturze komórek wywołanych przez różne wirusy z grupy wirusa smugowatości ziemniaka (PVY). Edwardson [1] proponuje uznać obecność inkluzji cytoplazmatycznych jako charakterystyczny symptom porażenia wirusami nitkowatymi z grupy smugowatości ziemniaka.

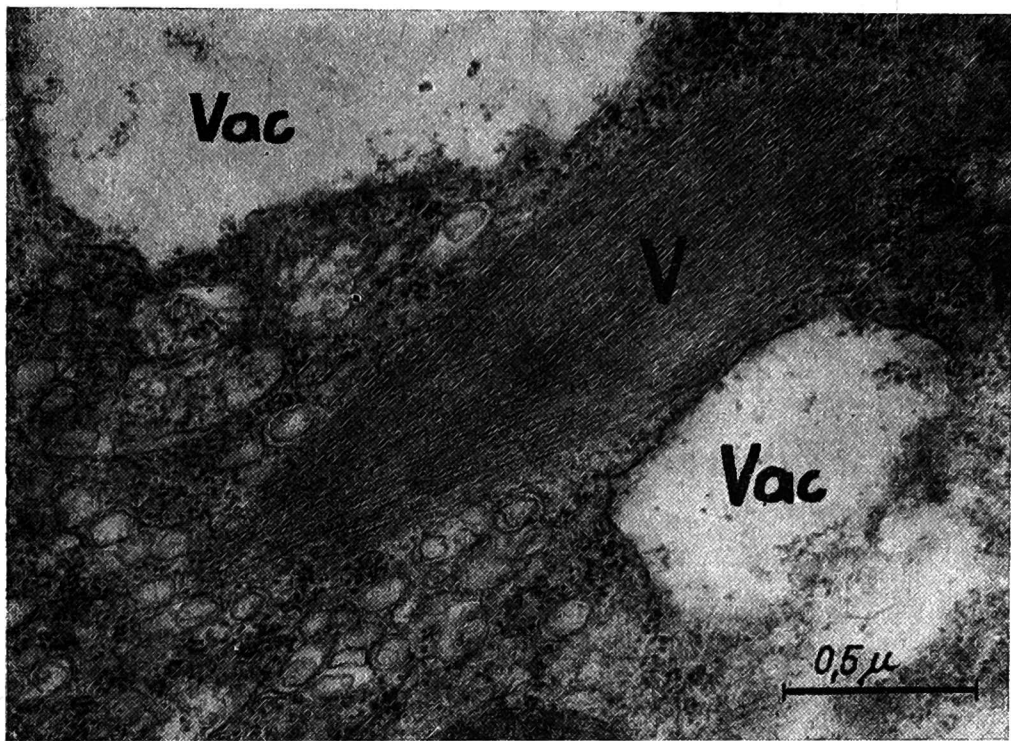
MATERIAŁ I METODY

Wirus mozaiki buraka używany do badań utrzymywany był w roślinach doniczkowych buraka cukrowego odmiany AJ Poly 1. Rośliny do testów wyprowadzane były z nasion tej samej odmiany. Po osiągnięciu stadium 6-8 listków połowę roślin zakazano mechanicznie inokulum przyrządzonym z liści roślin chorych. Druga połowa roślin z tej samej serii służyła jako kontrola. Do badań mikroskopowych pobierano liście z wyraźnymi objawami porażenia systemicznego, 40 dni po inokulacji. Materiał pobierano osobno z części liści zielonych oraz żółtawych. Tkanki utrwalano w 3% aldehydzie glutarowym w 0,025 M buforze fosforanowym o pH 7,3 oraz w 1% kwasie osmowym w tym samym buforze, odwadniano przez serie alkoholowo-acetonowe i tlenku propylenu. Materiał zatapiano w Eponie. Bloczki eponowe były krojone nożami szklanymi na ultramikrotomie, barwione octanem uranylu i cytrynianem ołowiu oraz przeglądane w mikroskopie elektronowym firmy Siemens Elmiskop I.

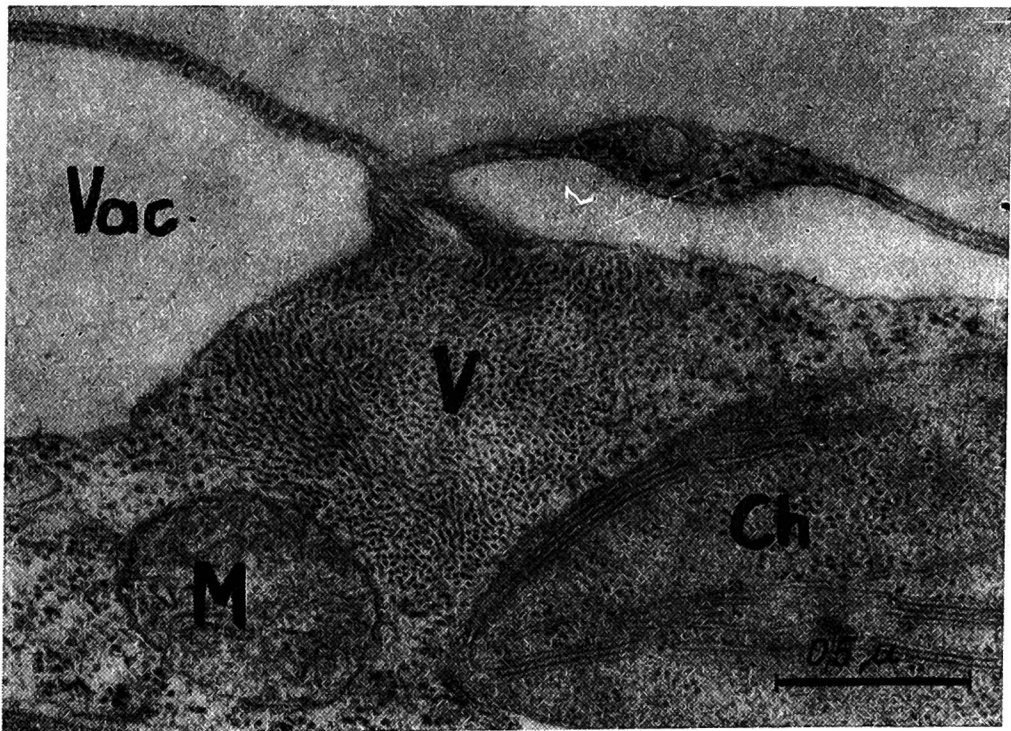
WYNIKI

Na podstawie otrzymanych elektronogramów uzyskano wiadomości na temat lokalizacji i różnorodności inkluzji w badanym materiale. Zajmowano się zarówno obserwacją komórek łyka, jak i komórek miękiszowych liścia. Materiał kontrolny nie zawierał ani inkluzji cytoplazmatycznych, ani skupisk lub pojedynczych cząstek wirusowych. W materiale zainfekowanym stwierdzono bardzo liczne skupiska wirusów, widocznych na przekrojach podłużnych i skośnych jako lekko faliste cząstki (rys. 2), a na przekrojach poprzecznych jako okrągłe struktury, które wielkością odpowiadały wirusowi mozaiki buraka i różniły się wielkością od leżących w cytoplazmie rybosomów (rys. 3 i 4). Komórki łyka były często całkowicie wypełnione zbitymi agregatami wirusowymi.

Wszystkie inkluzje w materiale porażonym były umiejscowione w cytoplazmie. Nie znaleziono inkluzji w jądrze komórkowym, chloroplastach i mitochondriach. Inkluzje nie były otoczone membranami plazmatycznymi i zbudowane były z materiału optycznie elektronowo gęstego. Inkluzje cytoplazmatyczne przeważnie występowały w komórkach miękiszu

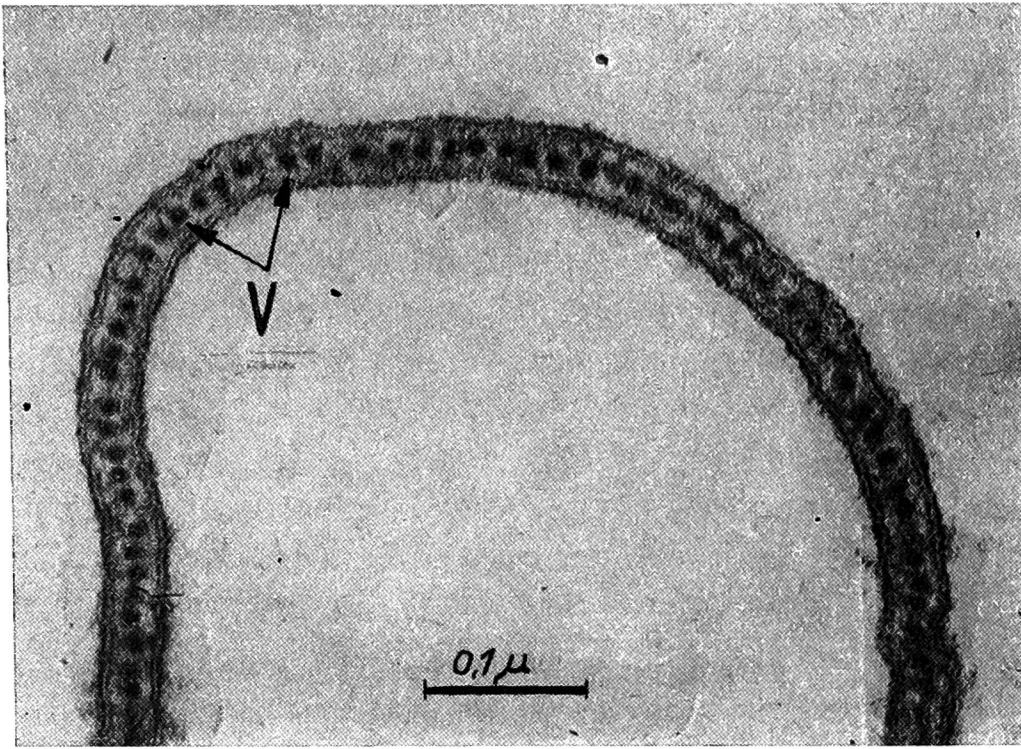


Rys. 2. Komórka mięszkowa liścia z cząstkami wirusa w cytoplazmie przekrojonymi podłużnie;
V — wirus, Vac — wakuola



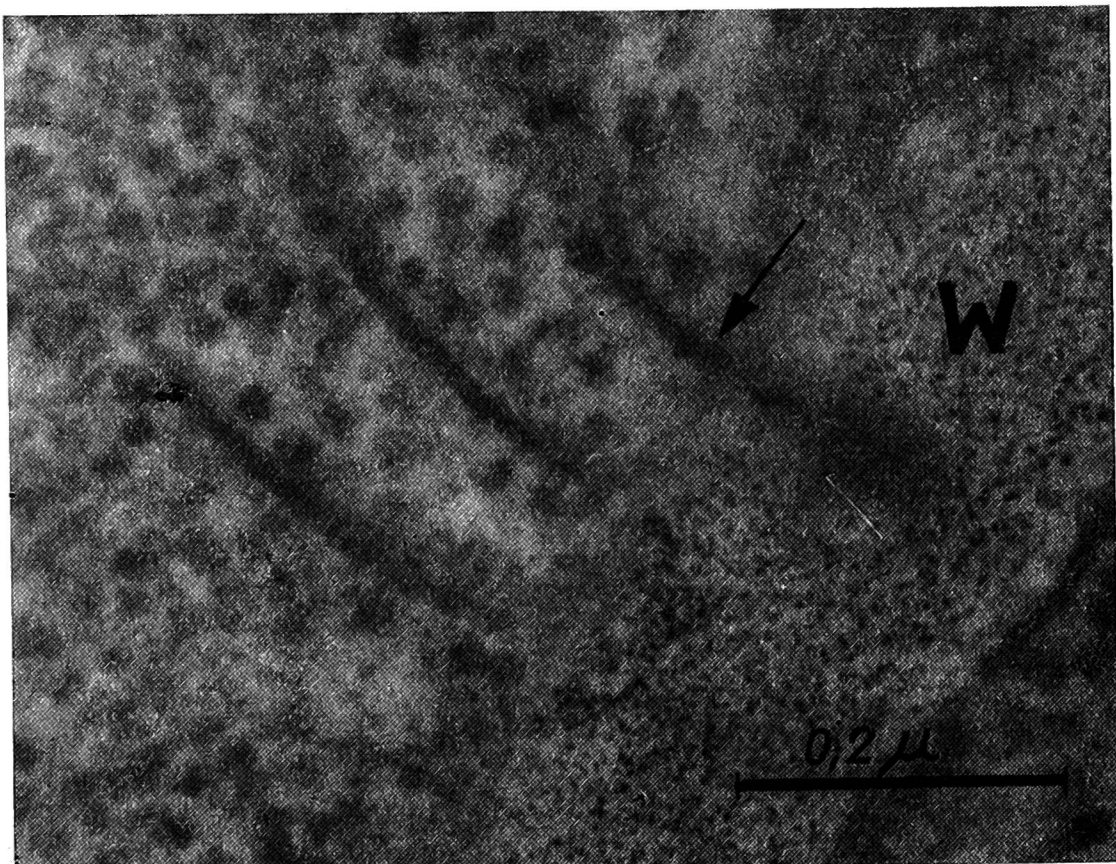
Rys. 3. Komórka mięszkowa liścia z cząstkami wirusa w cytoplazmie przekrojonymi poprzecznie i skośnie;
Ch — chloroplast M — mitochondrium, V — wirus, Vac — wakuola

palisadowego i gąbczastego liścia. W komórkach łyka spotykano jedynie pojedyncze inkluzje. Również ciekawa jest obserwacja, że chlorotyczne części liścia były znacznie bogatsze w inkluzje niż żywo zielone. Cytoplazmatyczne inkluzje występowały w postaci inkluzji wiązkowych, płytkowatych i rozetowych.



Rys. 4. Cząstki wirusa w przekroju poprzecznym (V)

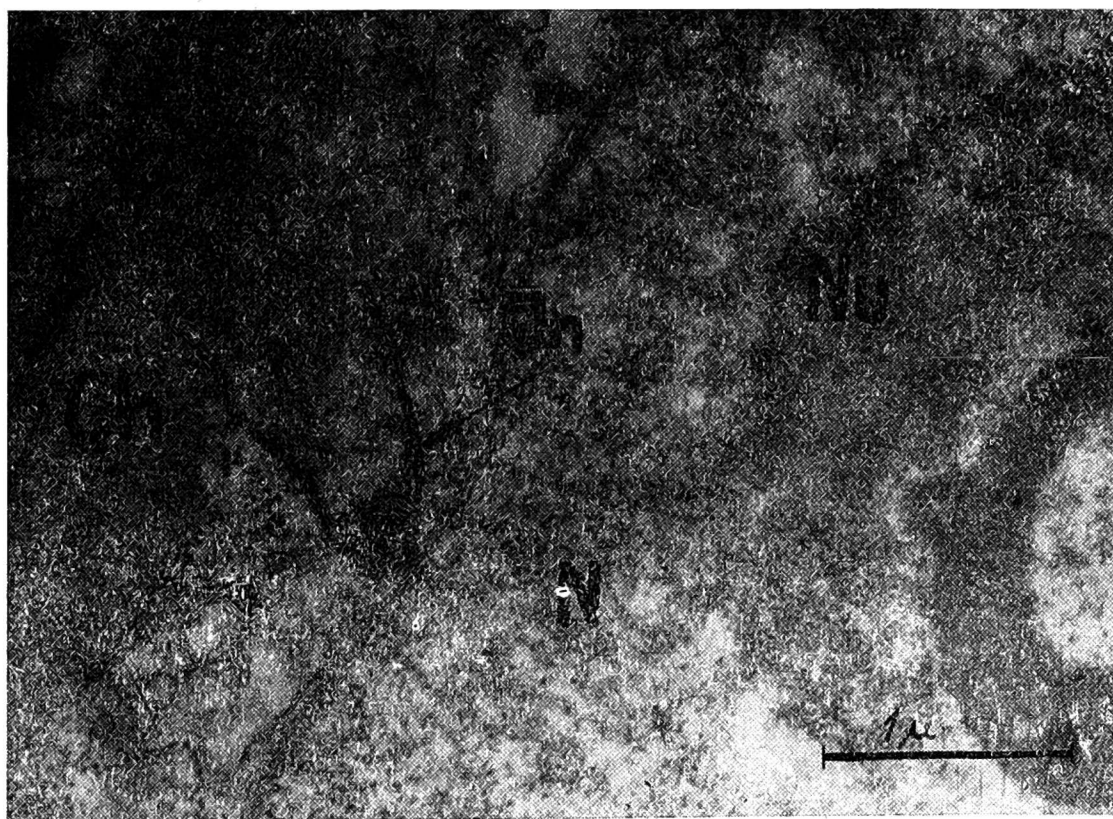
Inkluzje wiązkowe występowały w wiązkach po kilka. W badanym materiale były one nieliczne i miały postać cienkich, prostych blaszek o długości około 300-650 nm. Ich cechą charakterystyczną jest usytuowanie w cytoplazmie. Wszystkie znalezione inkluzje wiązkowe ułożone były prostopadle do ściany komórkowej. Zawsze jednym ze swych końców dotykały plazmolemmy. Drugi koniec inkluzji bardzo często



Rys. 5. Inkluzje wiązkowe. Jedna z inkluzji (strzałka) styka się z plazmodesmą; W — ściana komórkowa

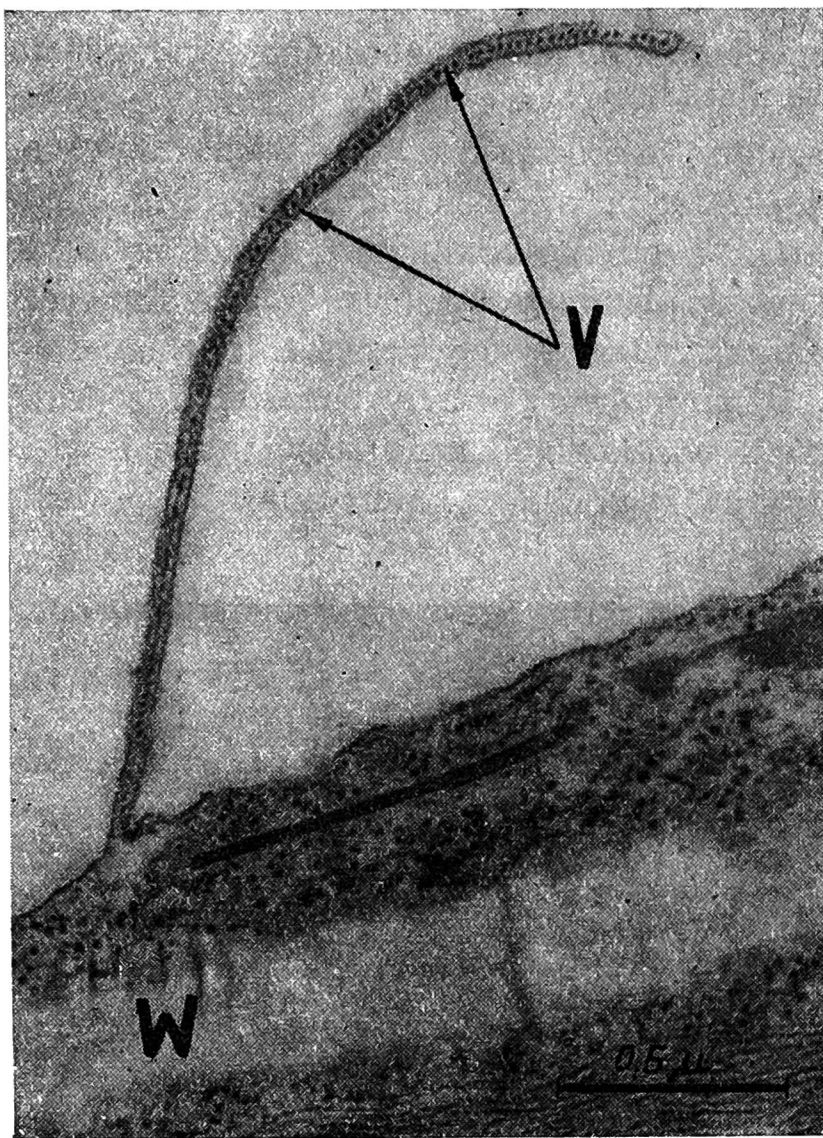
uwypuklał tonoplast w kierunku wakuoli. Jednak prawdopodobnie nigdy nie przebijał tonoplastu, bo nie stwierdzono występowania go w wakuolach. Często inkluzje wiązkowe leżały naprzeciw plazmodesm, co nasuwa przypuszczenie, że inkluzje mogą przedostawać się przez nie do sąsiednich komórek. Jeden wycinek elektronogramu pokazuje lekko skośnie ścięty skrawek z trzema inkluzjami wiązkowymi, z których jedna ściśle połączona jest z plazmodesmą (rys. 5). Nie stwierdzono całkowitego przebicia się inkluzji wiązkowych poprzez plazmodesmy.

Inkluzje płytkowate były bardziej złożone w budowie i różniły się od inkluzji wiązkowych umiejscowieniem i wielkością. Inkluzje płytkowate rozłożone były luźno, nieregularnie na terenie cytoplazmy



Rys. 6. Inkluzje płytkowate leżące w cytoplazmie między jądrem i chloroplastem; Ch — chloroplast, In — inkluzja, N — jądro, Nu — jąderko

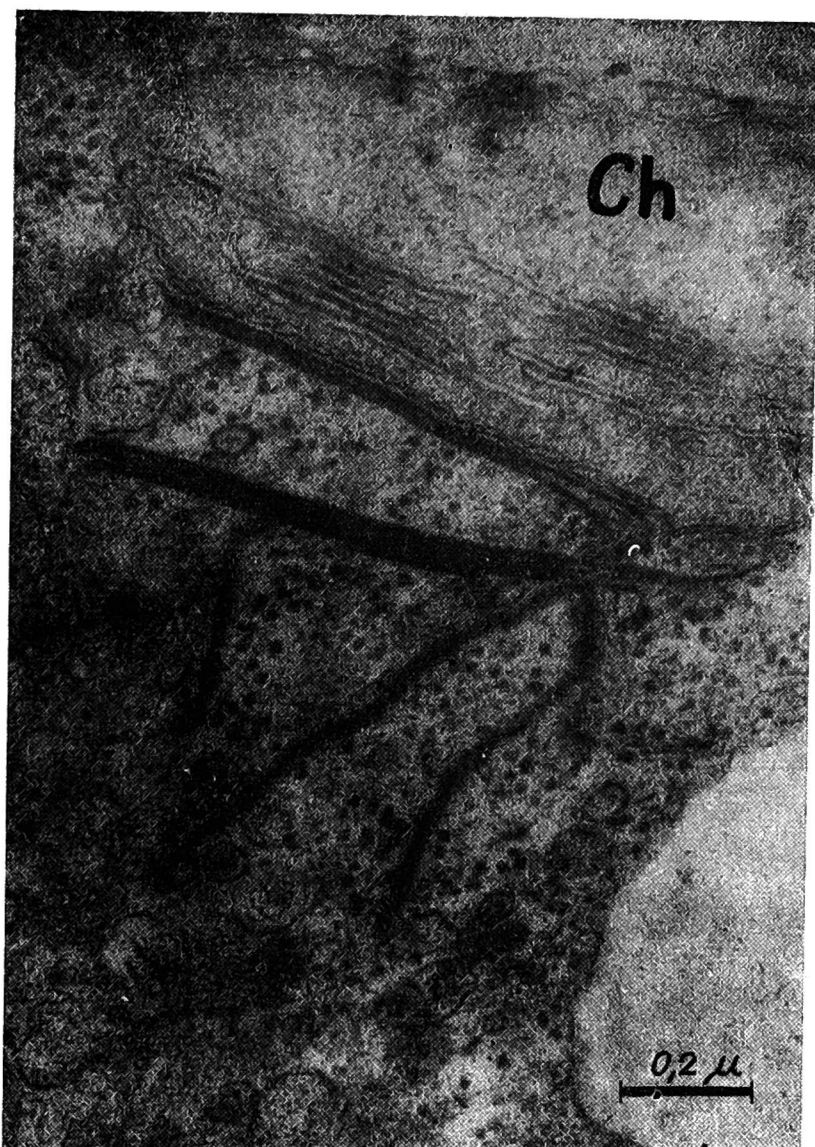
(rys. 6-10). Nigdy nie były związane z plazmolemmą. Długość tych inkluzji była różna. Prawdopodobnie zależało to od kierunku przekroju ultraskrawków. Spotykano inkluzje od około 300 nm aż do 2200 nm długości. Ich średnica wahała się w granicach od 30 nm do 120 nm. Zakończenia inkluzji płytkowatych często rozdzielały się na cienkie pasemka z czego można wnioskować, że składają się one z szeregu płaskich płytek ułożonych równolegle [8, 9]. Inkluzje płytkowate występowały bardzo licznie w komórkach mięksiszowych liści. Były one najliczniejsze spośród omawianych. Na przekrojach podłużnych miały postać lekko falistą, co ułatwiało im prawdopodobnie układanie się pomiędzy wszystkimi składnikami protoplastu. Spotykano je bowiem ułożone pomiędzy chloropla-



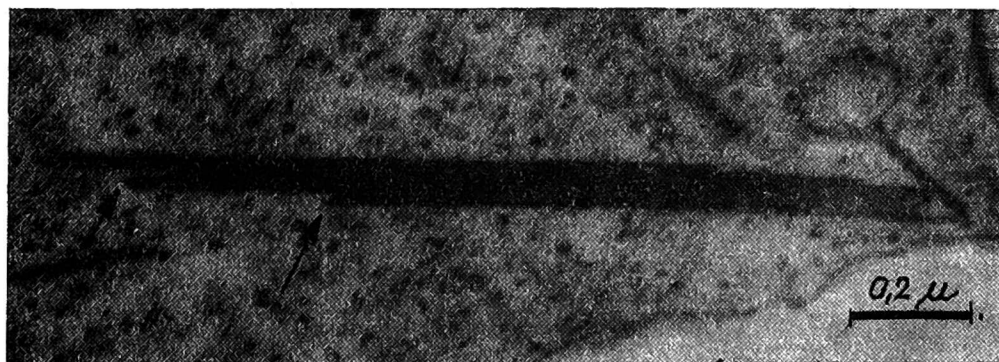
Rys. 7. Inkluzja płytkowata leżąca wzdłuż ściany komórkowej;
W — ściana komórkowa, V — wirus

stami, mitochondriami, peroksosomami i wokół jądra komórkowego. Nie-raz obserwowano wpuklanie się membran poszczególnych składników protoplastu do ich wnętrza pod naciskiem grubych inkluzji płytkowatych, ale analizy seryjnych skrawków udowodniły, że membrany te nie zostały przebite. Inkluzje płytkowate leżały między kanałami retikulum endoplazmatycznego i wielokrotnie ściśle przylegały do membran retikulum wzdłuż całej swej długości, względnie stykały się z nimi jednym końcem (rys. 10).

Najciekawszymi pod względem struktury były inkluzje rozetowe (rys. 11 i 12). Leżały one luźno rozmieszczone w cytoplazmie, pojedynczo względnie w większych skupieniach. Czasem były widoczne bardzo blisko ściany komórkowej. Nie stwierdzono przechodzenia ich przez plazmodesmy. Pojedyncza inkluzja przedstawiała się jako grupa zakrzywionych promieniście membran wokół centrum w postaci krążka. Liczba ramion badanych inkluzji była różna (od 3 do 7). Najczęściej występowały jednak inkluzje 5-cio ramienne. Długość ramion była także zróżnicowana i wahała się od 300 do 730 nm. Średnica centrum inkluzji rozeto-

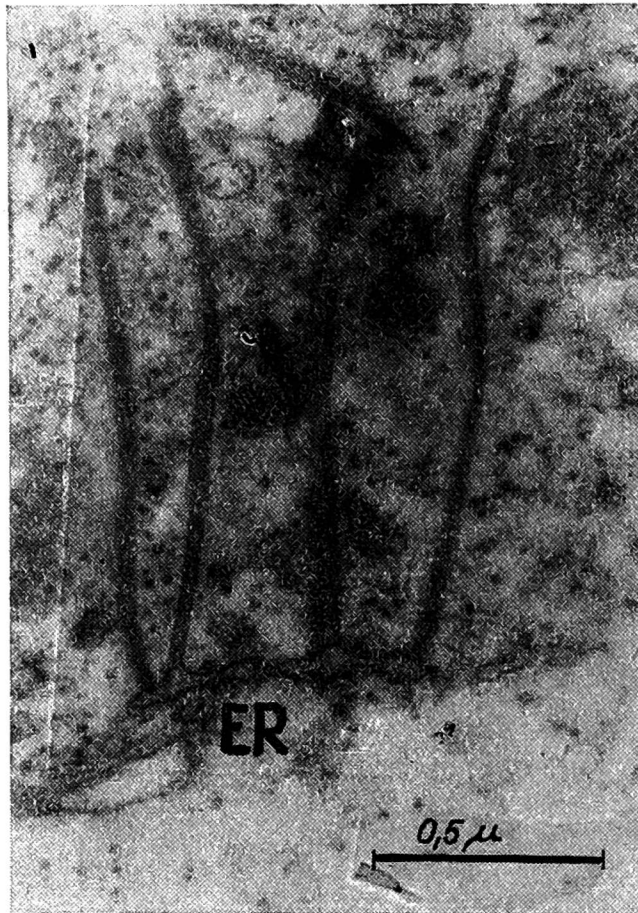


Rys. 8. Inkluzje płytkowate rozdzielające się na cieńsze płytki;
Ch — chloroplast

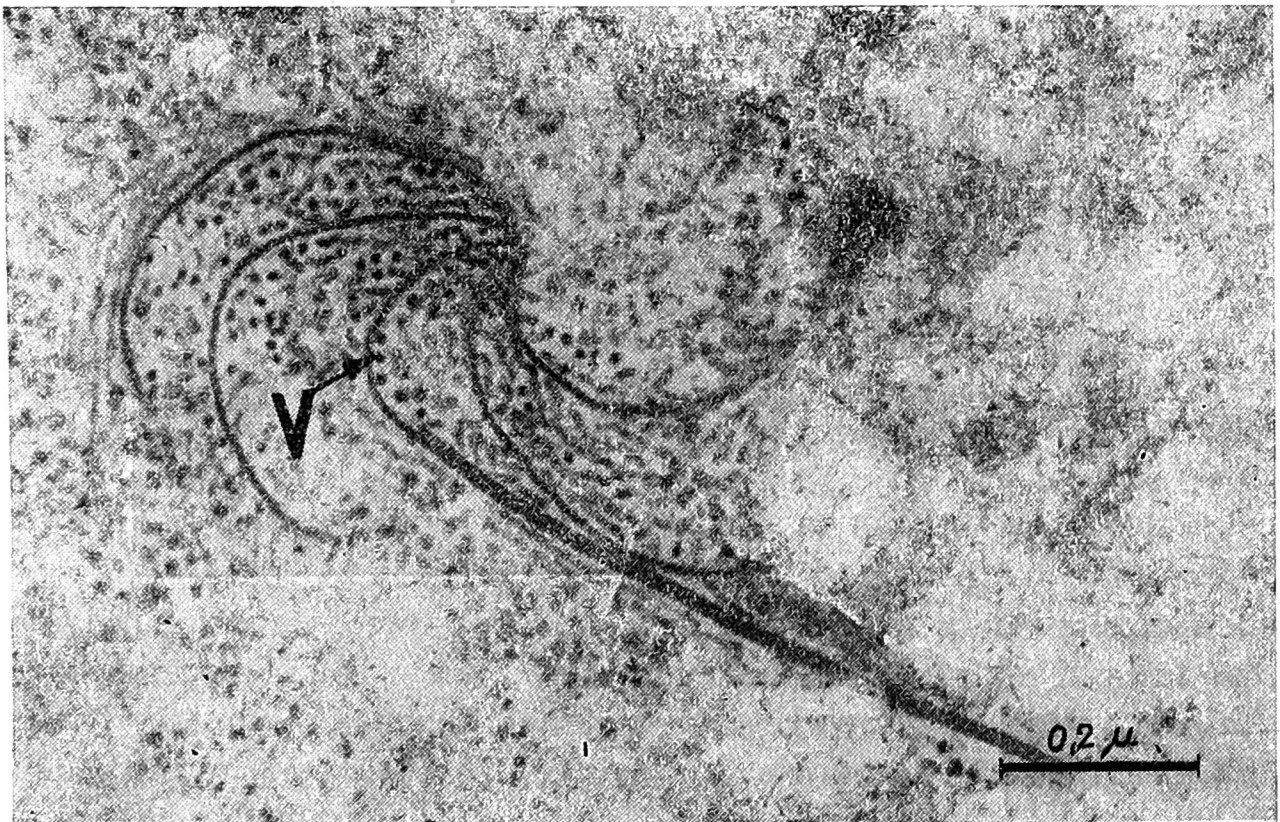


Rys. 9. Zakończenia inkluzji płytkowatej rozdzielone na cienkie płytki (strzałki)

wych wynosiła około 24 nm. W przestrzeniach między ramionami inkluzji rozetowych znajdowano licznie występujące wirusy mozaiki buraka. Nieraz wirusy ściśle przylegały do rozchodzących się ramion. Niektóre sąsiadujące inkluzje rozetowe stykały się ze sobą jednym lub kilkoma ramionami (rys. 12). Cienkie ramiona inkluzji rozetowych były często połączone z inkluzjami płytkowatymi. Był to jedyny dostrzegalny związek pomiędzy wszystkimi badanymi inkluzjami.



Rys. 10. Inkluzje płytkowate stykają się z kanałem retikulum endoplazmatycznego (Er)



Rys. 11. 5-cio ramienna inkluzja rozetowa; pomiędzy ramionami inkluzji widoczne wirusy (V) w przekroju poprzecznym



Rys. 12. Grupa inkluzji rozetowych. Ramiona poszczególnych inkluzji łączą się ze sobą (strzałki)

DYSKUSJA

Wyniki naszych badań zgodne są z wynikami uzyskanymi przez Hoeferta [5], który w krótkim doniesieniu podaje opis zmian w ultrastrukturze komórek liści buraka badanych po 6-ciu dniach od inokulacji wirusem mozaiki buraka. Znajdował on wszystkie opisane przez nas formy inkluzji, chociaż nie podaje nasilenia ich występowania. Nieliczne cząstki wirusa znajdował w komórkach wiązek przewodzących. Dokładniejsze obserwacje przeprowadzili Russo i Martelli [10] na roślinach *Gomphrena globosa* L. zainfekowanych wirusem mozaiki buraka. Ich badania obejmowały pięć terminów pobierania prób, od 5 do 43 dnia po inokulacji. Ostatni termin pobrania materiału zgadzał się z naszym terminem pobrania prób. Według opublikowanych przez tych badaczy danych, inkluzje wiązkowe i rozetowate występowały bardzo licznie w pierwszym okresie po inokulacji, a inkluzje płytkowate najliczniej w ostatnim terminie pobierania materiału. Porównując miejsce, budowę i liczebność spotykanych inkluzji, stwierdzamy, że otrzymaliśmy podobne wyniki jak Russo i Martelli, którzy nie zaobserwowali tylko pojawiania się już inkluzji rozetowych w 43 dniu po inokulacji. Również na naszych elektrogramach zaobserwowano liczniejsze agregaty cząstek wirusowych.

Znaleziono wiele informacji dotyczących inkluzji cytoplazmatycznych tworzących się pod wpływem innych wirusów z grupy smugowatości ziemniaka. Najobszerniejsze badania przeprowadził Edwardson [1], który opisał inkluzje cytoplazmatyczne wywołane wirusem smugowatości ziem-

niaka, zwykłej mozaiki fasoli, mozaiki kawonu, cętkowanej plamistości tytoniu, mozaiki sałaty i mozaiki trzciny cukrowej. Porównując te inkluzje podał hipotezę [2], że inkluzje rozetowe na przekroju podłużnym powinny wyglądać jak cylinder składający się z kilku zakrzywionych, zawijających się wokół osi ramion. Pogląd ten wydaje się być przekonujący. Równocześnie badacz ten uważa, że wiązkowe inkluzje są przekrojem podłużnym tych struktur cylindrycznych. Jego obserwacje dotyczące inkluzji płytkowatych całkowicie pokrywają się z naszymi.

Bardzo ciekawe obrazy otrzymali Lawson i Hearon [9] na brazylijskim powoju *Ipomoea setosa* Ker. zainfekowanym wirusem z grupy Y oznaczonym przez nich jako wirus batatu. Zaobserwowali oni ściśle połączenie inkluzji rozetowych z plazmodesmami i dlatego wysunęli wniosek, że plazmodesmy są miejscem tworzenia się tych inkluzji. Wielu autorów [1-3, 5-8, 10], podobnie jak w naszych badaniach, zaobserwowało ścisły związek inkluzji cytoplazmatycznych z kanałami retikulum endoplazmatycznego a więc z centrum aktywności metabolicznej komórki oraz plazmolemmą. Trudno jednak dotychczas wyjaśnić, czy te cytomembrany przyczyniają się wprost do tworzenia się inkluzji, czy raczej stanowią tylko wsparcie dla nich. Wobec powyższego proces powstawania inkluzji jest jeszcze kwestią niezbadaną.

Shepard [11] sugeruje, że są one pochodzenia białkowego, a Kamei i inni [6] zakładają, że inkluzje cytoplazmatyczne powstają w wyniku akumulacji nadmiaru białka wirusowego. Ci ostatni autorzy próbują także wyjaśnić związek pomiędzy inkluzjami płytkowatymi a wirusami żółtej mozaiki fasoli, pokazując zdjęcie lekko skośnie ściętego skrawka, na którym widać inkluzje płytkowate, z których wystają cząstki wirusa. Trudno jest jednak zdecydować, czy obrazy te są wynikiem skośnie ściętego skrawka, czy też rzeczywiście wirusy pochodzą z tej inkluzji, tym bardziej, że kilku autorów podaje bliską współzależność między inkluzjami i cząstkami wirusów [3, 10].

Porównując wyniki prac Russo i Martelli [10] oraz Lawson i Hearon [9] z naszymi badaniami, wysuwamy wniosek, że cząstki wirusowe rzadziej występują pomiędzy membranami inkluzji rozetowych we wczesnych stadiach po inokulacji, aniżeli w późniejszych.

LITERATURA

1. Edwardson J. R.: Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Am. J. Bot.*, 1966, t. 53, s. 359-364.
2. Edwardson J. R.: Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science*, 1966, t. 153, s. 883-884.
3. Edwardson J. R., Purcifull D. E., Christie R. G.: Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses. *Virology*, 1968, t. 34, s. 250-263.

4. Esau K.: Anatomical and cytological studies on beet mosaic. J. agric. Res., 1944, t. 69, s. 95-117.
5. Hoefert L. L.: Proteinaceous and virus-like inclusions in cells infected with beet mosaic virus. Virology, 1969, t. 37, s. 498-501.
6. Kamei T., Honda Y., Matsui C.: Intracellular appearance of turnip mosaic and bean yellow mosaic virus particles. Phytopath., 1969, t. 59, s. 139-144.
7. Kim K. S., Fulton J. P.: Electron microscopy of pokeweed leaf cells infected with pokeweed mosaic virus. Virology, 1969, t. 37, s. 297-308.
8. Krass C. J., Ford R. E.: Ultrastructure of corn systemically infected with maize dwarf mosaic virus. Phytopath., 1969, t. 59, s. 431-439.
9. Lawson R. H., Hearon S. S.: The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. Virology, 1971, t. 44, s. 454-456.
10. Russo M., Martelli G.: Cytology of *Gomphrena globosa* L. plants infected by beet mosaic virus (BMV). Phytopath., Mediterranea, 1969, t. 8, s. 65-82.
11. Shepard J. F.: Electron microscopy of subtilisin — treated tobacco etch virus nuclear and cytoplasmic inclusions. Virology, 1968, t. 36, s. 20-29.
12. Zimmer K., Brandes J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Rübenmosaic-Virus. Phytopath. Z., 1956, t. 26, s. 419-422.
13. Zwolińska-Śniatałowa Z., Grela T.: Biochemiczne zmiany w zawartości niektórych składników liści buraka cukrowego zachodzące pod wpływem porażenia wirusem mozaiki (*Beta virus 2*, Smith). Biul. Inst. Ochr. Rośl., 1969, z. 44, s. 137-146.

Тадеуш Греля, Лидия Дунайска

ВИРУСНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В ЛИСТЬЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ПОРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ МОЗАИКИ СВЕКЛЫ (*BETA VIRUS 2*, SMITH). ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

Настоящие исследования являются фрагментом работы, начатой по установлению изменений в ультраструктуре клеток сахарной свеклы, зараженной мозаикой свеклы. Для микроскопических исследований были взяты листья сахарной свеклы сорта АЙ Поли 1 с отчетливыми систематическими признаками, по истечении 40 суток от времени инокуляции. Материал был затоплен в Эпоне. Проводились наблюдения над клетками флоэмы и клетками паренхимы листьев. Контрольный материал не содержал цитоплазматических включений и скоплений вирусов. В зараженном материале установлено появление многочисленных скоплений и включений. Включения главным образом находили в клетках палисадной и губчатой паренхимы листа. Хлоротические участки листа были богаче включениями, чем ярко зеленые отрезки листьев. Включения были локализованы только на цитоплазме. Найдено 3 формы включений: пучковые, пластинчатые, и розеточные.

Пучковые включения появлялись в исследуемом материале немногочисленно и были расположены перпендикулярно к клеточной стенке. Из наблюдаемых включений пластинчатые включения были наиболее многочисленными. Они были распределены в цитоплазме нерегулярно свободно. Установлена тесная связь пластинчатых включений с каналами эндоплазматического ретику-

лума. Розеточные включения были расположены одиночно или же в больших скоплениях. Чаще всего появлялись 5-плечные включения. Между плечами включений находили многочисленно появляющиеся вирусы в поперечном разрезе. В дальнейших исследованиях будем стараться выяснить связь между включениями и вирусами.

Tadeusz Grela, Lidia Dunajska

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON VIRAL INCLUSIONS
IN LEAVES OF SUGAR BEET PLANTS INFECTED WITH BEET
MOSAIC VIRUS (*BETA VIRUS 2*, SMITH)

Summary

Changes caused in the ultrastructure of the cells of sugar beet plants by infection with beet mosaic virus were investigated. For electron microscopic studies leaves with distinct systemic symptoms, taken from infected sugar beet plants (var. AJ Poly 1) on the 40th day after inoculation, as well as control leaves from a healthy plant of the same age, were used. The material was embedded in Epon after previous fixation in glutaraldehyde and osmic acid. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, where upon they were examined in a Siemens electron microscope. Phloem and parenchymal cells of the leaves were observed.

Control plant material was found to contain neither cytoplasmatic inclusions nor virus aggregates. In the infected material numerous aggregates and inclusions were observed. Inclusions occurred only in the cytoplasm; they were mainly found in the cells of the palisade and spongy parenchyma. Sections from the chlorotic parts of leaf showed more inclusions than those from the intensely green parts. There were three forms of inclusions: 1. bundled inclusions, 2. laminated inclusions, 3. pinwheel inclusions. Bundled inclusions were scarce; they were always oriented perpendicularly to the cell wall. Laminated inclusions loosely and unevenly distributed in the cytoplasm were most numerous. They were closely connected with the canals of the endoplasmatic reticulum. Pinwheel inclusions were arranged singly or in greater agglomerations. Five-pointed inclusions were most frequent. Between the points of the inclusions numerous viruses occurring in cross-section were observed. In subsequent studies it will be attempted to elucidate the relationship between the inclusions and viruses.