

Ultrastructural studies of tissue of tomato leaves infected by *Tomato torrado virus* and *Pepino mosaic virus*

Badania ultrastrukturalne tkanek liści pomidora zainfekowanego wirusem nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*) i wirusem mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*)

Beata Hasiów-Jaroszewska, Lidia Zielińska, Julia Byczyk, Natalia Rymelska, Natasza Borodynko

Summary

Tomato plants are often infected by viral pathogens belonging to different families. As a result of virus-host interaction numerous mechanisms in plants are induced, such as appearance of additional structures and inclusions in the cytoplasm, or changes in a structure of organelles.

For this reason, the analyses of cytological changes within the leaf of tomato, induced by *Tomato torrado virus* (ToTV) and *Pepino mosaic virus* (PepMV) were performed. The presence of viral particles in various compartments of individual cell types, arranged specifically for each type of virus was observed. Moreover, in both cases we observed changes in activity of the organelles responsible for the metabolic processes (chloroplasts, mitochondria) and thickened of the cell wall.

Key words: cytopathological alteration, electron microscope, *Solanum lycopersicum*, ultrastructure

Streszczenie

Rośliny pomidora są często porażane przez wirusy należące do różnych rodzin. W komórkach roślinnych, w wyniku oddziaływań pomiędzy wirusem a gospodarzem można zaobserwować pojawianie się dodatkowych struktur oraz inkluzji w cytoplazmie, czy też zmiany w obrębie struktury organelli, prowadzące w konsekwencji do osłabienia i śmierci komórek.

Z tego względu wykonano analizę zmian cytologicznych w obrębie blaszki liściowej pomidora, indukowanych w wyniku infekcji wirusem nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV) oraz wirusem mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV). Zaobserwowano obecność cząstek wirusowych w różnych kompartmentach poszczególnych typów komórek, uorganizowanych w sposób charakterystyczny dla danego typu wirusa. Ponadto w obu przypadkach obserwowano zmiany w aktywności organelli odpowiedzialnych za przeprowadzanie procesów metabolicznych (chloroplasty, mitochondria) oraz pogrubianie się ściany komórkowej.

Słowa kluczowe: zmiany cytopatologiczne, mikroskop elektronowy, *Solanum lycopersicum*, ultrastruktura

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
B.Hasiow@iorpib.poznan.pl

Wstęp / Introduction

Wirus nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV) i wirus mozaiki pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) są jednymi z groźniejszych patogenów infekujących pomidora, powodującymi olbrzymie straty w ilości i jakości plonu. Wirus nekrozy pomidora jest wirusem sferycznym o średnicy 25–28 nm, z rodzaju *Torradovirus*. Po raz pierwszy zaobserwowano go w Polsce w 2003 roku i od tego czasu zidentyfikowano trzy izolaty tego wirusa, oznaczone jako: ToTV-Wal'03, ToTV-Ros i ToTV-Kra. Na pomidorze w zależności od odmiany, wirus ten może powodować bardzo zróżnicowane objawy chorobowe od częściowej nekrozy (rys. 1A) i mozaiki przez całkowitą nekrozę liści, a nawet wierzchołków roślin, silne zahamowanie wzrostu oraz obniżenie plonu. ToTV może być efektywnie przenoszony zarówno mechanicznie, jak i przez mączlika szklarniowego (*Trialeurodes vaporariorum*) (Pospieszny i wsp. 2010).

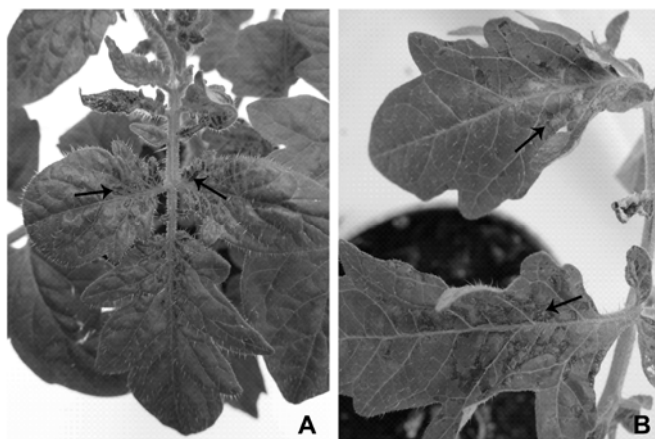
Wirus mozaiki pepino jest wirusem nitkowatym o długości 530–570 nm, należącym do rodzaju *Potexvirus*. Opisane dotąd izolaty PepMV charakteryzują się różnym zakresem roślin żywicielskich oraz symptomami wywo-

ływanymi na roślinach. Na pomidorze szklarniowym zidentyfikowano go m.in. w USA, Kanadzie i Chile (Marron-Lango i wsp. 2005; Ling 2007); w Polsce występuje od 2003 roku. Wirus cechuje się dużym zróżnicowaniem genetycznym. Dotychczas udało się zidentyfikować jego 4 szczepy: europejski – EU, peruwiański – LP, amerykański 1 – US1 oraz chilijski 2 – CH2 (Ling 2007; Hasiów i wsp. 2008; Pospieszny i wsp. 2008).

Celem pracy było prześledzenie zmian ultrastrukturalnych w obrębie porażonych tkanek powodowanych przez wirusy pomidora (wirus mozaiki pepino i wirus nekrozy pomidora). Do badań ultrastrukturalnych wybrano izolat ToTV-Wal'03 oraz PepMV-P19, ponieważ powodują one nekrozy na roślinach pomidora (rys. 1B) (Hasiów-Jaroszewska i wsp. 2009; Pospieszny i wsp. 2010).

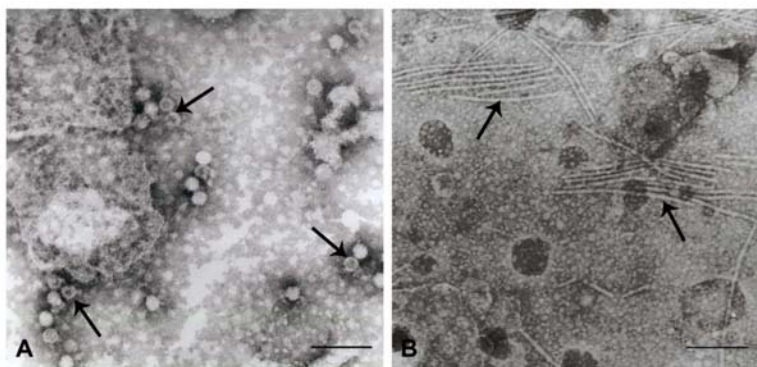
Materiały i metody / Materials and methods

Materiałem do badań były rośliny testowe: *Solanum lycopersicum* odmiana Beta Lux, *Nicotiana benthamiana* i *N. tabacum* odmiana Xanthi nc. Rośliny inokulowano



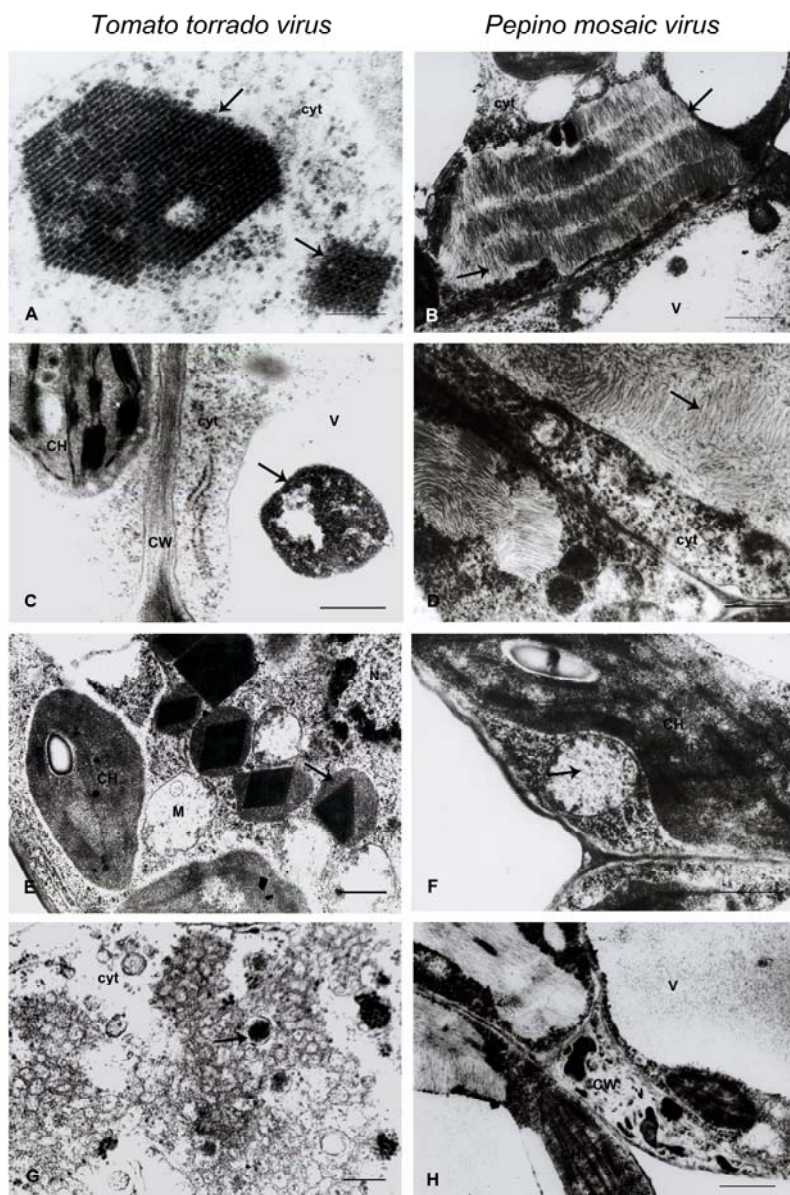
Rys. 1. Rośliny *S. lycopersicum* porażone (A) wirusem nekrozy pomidora, (B) wirusem mozaiki pepino, miejsca nekroz oznaczono strzałkami

Fig. 1. *S. lycopersicum* infected with (A) *Tomato torrado virus*, (B) *Pepino mosaic virus*, arrows indicated necrosis on leaves



Rys. 2. Identyfikacja cząstek wirusowych w soku pochodzącym z porażonych roślin. (A) sferyczne cząstki wirusa nekrozy pomidora [strzałki]; skala = 100 nm, (B) nitkowate cząstki wirusa mozaiki pepino [strzałki]; skala = 200 nm

Fig. 2. Identification of viral particles in sap from infected plant. (A) spherical particles of *Tomato torrado virus* [arrows]; bar = 100 nm, (B) filamentous particles of *Pepino mosaic virus* [arrows]; bar = 200 nm



Rys. 3. Analiza cytologiczna zainfekowanych roślin. (A) kryształ złożony z izometrycznych wirionów [strzałki] w cytoplazmie (cyt) komórek towarzyszących floemu; skala = 0,2 μm , (B) taśmowate agregaty cząstek wirusowych [strzałki] w cytoplazmie komórek miękiszowych liścia; skala = 1 μm , (C) grupa cząstek wirusowych [strzałka] otoczona przez błonę w wakuoli (V); CH – chloroplast, CW – ściana komórkowa; skala = 0,2 μm , (D) liczne wirusy nierównomiernie rozmieszczone wewnątrz wakuoli [strzałka]; skala = 0,75 μm , (E) peroksisomy zawierające struktury krystaliczne [strzałka] oraz kondensacja chromatyny w jądrze komórkowym (N); M – mitochondrium, N – jądro; skala = 0,5 μm , (F) degradacja wewnętrznej błony mitochondrialnej [strzałka]; skala = 1,5 μm , (G) nagromadzenie struktur pęcherzykowych i błoniastych w wyniku obecności cząstek wirusowych [strzałka] na terenie cytoplazmy; skala = 0,2 μm , (H) silnie pogrubienie ściany komórkowej (CW), poprzez nakładanie materiałów drobnoziarnistych, amorficznych, ciemno wybarwionych; skala = 1 μm

Fig. 3. Cytological analysis of infected plants. (A) Crystal of isometric virions [arrows] in the cytoplasm (cyt) of phloem companion cell; bar = 0.2 μm , (B) Line aggregate of virus particles [arrows] in the cytoplasm of mesophyll cell; bar = 1 μm , (C) Group of virus particles [arrow] surrounded by a membrane in the vacuole (V); CH – chloroplast, CW – cell wall, bar = 0.2 μm , (D) Numerous virus particles distribute within the vacuole [arrows]; bar = 0.75 μm , (E) Group of peroxisomes with crystalline inclusions [arrow] and condense chromatin in the nucleus (N); M – mitochondria, N – nucleus, bar = 0.5 μm , (F) Degeneration of mitochondria, like reduction density of stroma or number of cristae [arrow]; bar = 1.5 μm , (G) Numerous vesicular and membranous structure due to the presence of viral particles [arrows] in the cytoplasm; bar = 0.2 μm , (H) Thickened of cell wall (CW); bar = 1 μm

mechanicznie izolatami ToTV-Wal'3 oraz PepMV-P19 i utrzymywano w warunkach szklarniowych (18–26°C). Inokulację powtarzano trzy razy, na co najmniej trzech roślinach testowych. Obserwacje prowadzono przez 3–4 tygodnie, następnie pobierano fragmenty tkanek do analizy cytologicznej. Niewielkie fragmenty tkanki

utrwalano 3 godziny w temperaturze pokojowej przy użyciu 3% aldehydu glutarowego w 0,025 M buforze fosforanowym, pH 7,5 i następnie przepłukiwano trzykrotnie przez 1 godzinę w tym samym buforze. Kolejno przeprowadzano utrwalanie następcze przy użyciu 2% czterotlenku osmu w buforze fosforanowym w tempera-

turze 4°C, przez 2 godziny i ponownie tkankę roślinną płukano w buforze. Fragmenty liści odwadniano w szeregu roztworów alkoholi i acetonów o wzrastających stężeniach i zatapiano w żywicy epoksydowej Epon 812. Po polimeryzacji (48 godzin, 60°C) materiał cięto na ultracienkie skrawki za pomocą szklanych noży na ultramikrotomie Reichert OM – U2 i barwiono przy użyciu octanu uranylu i cytrynianu ołowiu. Tak przygotowane preparaty obserwowano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym Philips EM-201 przy napięciu przyspieszającym 80 kV.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W soku pochodzącym z porażonych roślin zainfekowanych ToTV obserwowano cząstki wirusowe o średnicy 25–28 nm (rys. 2A), zaś w preparatach przygotowanych z roślin porażonych PepMV stwierdzono obecność cząstek nitkowatych o długości około 500 nm (rys. 2B).

Przeprowadzona analiza cytologiczna wykazała, że cząstki wirusowe występujące w zainfekowanych komórkach mogą układać się w bardziej lub mniej uporządkowany sposób, w różnych kompartmentach, zwłaszcza w cytoplazmie i wakuoli poszczególnych typów komórek. Dotychczas sądzono, że ToTV występuje tylko w rurek sitowych floemu (Alfaro-Fernandez i wsp. 2010). Przeprowadzone obserwacje wykazały obecność kryształów złożonych z cząstek ToTV nie tylko w obrębie tych komórek, ale także w mniejszej ilości m.in. na terenie cytoplazmy komórek miększu asymilacyjnego i komórek towarzyszących floemu (rys. 3A). Ponadto, obecność dużych agregatów złożonych z nieregularnie rozmieszczonych cząstek obserwowano w wakuolach komórek miększu (rys. 3C). Depozycja cząstek wirusowych na terenie cytoplazmy dotychczas była śledzona dla różnych typów wirusów (Francki i wsp. 1985). W trakcie badań zaobserwowano, że cząstki te nie są przypadkowo rozmieszczone na terenie wakuoli, tylko tworzą grupy cząstek otoczonych przez membrany (rys. 3C). Porażeniu roślin pomidora przez PepMV towarzyszyła obecność taśmowatych agregatów złożonych ze ściśle upakowanych,

regularnie ułożonych cząstek m.in. w cytoplazmie (rys. 3B). W tym przypadku w wakuoli nie obserwowano żadnego typu organizowania się cząstek (rys. 3D).

W wyniku oddziaływania obu wirusów na komórki gospodarza następowała indukcja szeregu zmian cytopatologicznych, prowadzących do obumierania komórek. W komórkach roślin porażonych ToTV obserwowano deformację chloroplastów w wyniku uwypuklenia stromy do cytoplazmy, nierównomierne rozmieszczenie chromatinu w jądrze komórkowym oraz pojawienie się licznych peroksysomów zawierających kryształy (rys. 3E). Infekcji wywołanej przez ToTV towarzyszyła bardzo silna wesiularyzacja i pojawianie się licznych struktur pęcherzykowatych i błoniastych na terenie cytoplazmy (rys. 3G). Podobne wyniki obserwacji uzyskali również Alfaro-Fernandez i wsp. (2010). Ponadto, zaobserwowano jednoczesne pojawianie się tych struktur w towarzystwie inkluzji pęcherzykowych, zanurzonych w amorficznych masach. W przypadku PepMV typowe było m.in. obniżenie aktywności mitochondriów, związane z degradacją wewnętrzną błony mitochondrialnej (rys. 3F) oraz pogrubianie ściany komórkowej (rys. 3H) związane najprawdopodobniej z reakcją obronną rośliny.

Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzona analiza wykazała, że obecność cząstek obydwu wirusów w obrębie protoplastu komórek gospodarza indukuje cytopatologiczne zmiany o różnym nasileniu, w obrębie takich struktur, jak: chloroplasty, mitochondria czy jądro komórkowe prowadzące w konsekwencji do śmierci komórek.
2. Obydwa wirusy wykazują tendencję do agregacji cząstek, zwłaszcza w przypadku ToTV obserwowano liczne struktury krystaliczne w różnych kompartmentach komórkowych.

Praca częściowo finansowana z projektu UMO-2011/01/D/NZ9/00279 Narodowego Centrum Nauki.

Literatura / References

- Alfaro-Fernández A., Medina V., Córdoba-Sellés M.C., Font M.I., Jornet J., Cebrián M.C., Jordá C. 2010. Ultrastructural aspects of tomato leaves infected by *Tomato torrado virus* (ToTV) and co-infected by other viruses. *Plant Pathol.* 59: 231–239.
- Francki R.I.B., Milne R.G., Hatt T. 1985. *Atlas of Plant Viruses*. CRC Press, Florida, Vol. I, 322 pp, Vol. II, 284 pp.
- Hasiów B., Borodynko N., Pospieszny H. 2008. Complete genomic RNA sequence of the Polish *Pepino mosaic virus* isolate belonging to the US2 strain. *Virus Genes* 36 (1): 209–214.
- Hasiów-Jaroszewska B., Pospieszny H., Borodynko N. 2009. New necrotic isolates of *Pepino mosaic virus* representing CH2 genotype. *J. Phytopathol.* 157 (7–8): 494–496.
- Ling K.S. 2007. Molecular characterization of two *Pepino mosaic virus* variants from imported tomato seeds reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34 (1): 1–8.
- Maroon-Lango C.J., Quaragna M.A., Jordan R.L., Hammond J., Bandla M., Marquardt S.K. 2005. Two unique US isolates of *Pepino mosaic virus* from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Arch. Virol.* 150: 1187–1201.
- Pospieszny H., Budziszewska M., Hasiów-Jaroszewska B., Obrepalska-Stepłowska A., Borodynko N. 2010. Biological and molecular characterization of Polish isolates of *Tomato torrado virus*. *J. Phytopathol.* 158: 56–62.
- Pospieszny H., Hasiów B., Borodynko N. 2008. Characterization of two distinct Polish isolates of *Pepino mosaic virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 443–445.