

**RĂSPUNSURI CITOPATICE INDUSE DE VIRUSURI LA
TOMATE CU DIFERITĂ REACȚIE LA PATOGENI**

**VIRUS-INDUCED CYTOPATHIC RESPONSES IN TOMATOES WITH
DIFFERENT REACTION TO PATHOGENS**

*Larisa ANDRONIC, ORCID: 0000-0002-2761-9917
Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor al USM,
Chișinău, Republica Moldova*

CZU: 632.38:635.64

e-mail: larisa.andronic@sti.usm.md

Evaluation of cells ultrastructure of the mesophyll and endothecium of tomato plants infected with tomato aspermy virus, tobacco mosaic virus, potato virus X, revealed the peculiarities of intracellular accumulation of particles and viral inclusions (Pinwheels structures, crystalloids), representing specific reactions (associated with virion replication and localization) which may serve as a criterion for pathogen detection. Also, are described the nonspecific reactions of organelles based on the typical restructuring principles, reflecting the pathogenicity of the viral agent. The cytopathic changes induced at the cellular level show heterogeneity in the degree of expression within a cell, as well as of the cells of the same tissue.

Keywords: *viruses, cell organelles, cytopathology, stereotypical reactions, viral inclusions.*

INTRODUCERE

Pe parcursul co-evoluției, virusurile au dezvoltat diferite strategii alternative pentru a asigura ciclul vital propriu care se află în concurență cu procesele celulare ale gazdei. Pentru explicarea procesului de patogeneză sunt propuse două modele generale potrivit cărora se analizează formarea simptomelor și dezvoltarea bolii. Modelul autogenezei competitive sugerează că replicarea virusurilor se produce cu o asemenea intensitate, încât să utilizeze la maximum resursele metabolice ale plantei, afectând astfel în mod negativ creșterea și dezvoltarea acesteia. Alternativ, conform celui de-al doilea model, simptomele de boală pot apărea prin perturbări ale proceselor cauzate de interacțiunea dintre componentele specifice ale virusului și cele ale gazdei.

Ciclul vital viral este un proces dinamic care contribuie la reorganizarea celulară a gazdei. Reproducerea virusurilor și dezvoltarea simptomelor sunt în relații de concurență cu elementele celulare ce asigură procesele de transcriere și translație. Caracterizarea compartimentării subcelulare constituie un element cheie pentru înțelegerea reorganizării spațio-temporale și a mecanismului molecular al infecției virale. Locali-

zarea subcelulară a componentelor virale și a virionilor reflectă strategia de replicare și asamblare a particulelor virale necesare pentru stabilirea unui proces infecțios [11]. Organitele celulare precum mitocondriile, reticulul endoplasmatic, peroxizomii joacă un rol important în asigurarea procesului infecțios și de apărare al gazdei [6]. Pentru mai multe virusuri este descrisă dependența de structurile nucleare [14]. De asemenea, incluziunile citoplasmatică, inclusiv viroplasmăle, concentrează proteinele virale și cele ale gazdei necesare pentru replicarea genomului viral, dar și protejează genomul viral de nucleazele celulare [2]. Pentru formarea acestor formațiuni virusurile modifică metabolismul în primul rând al acizilor grași, induc rearanjarea componentelor membranelor și, de asemenea, invocă constituenții celulari pentru sinteza enzimelor esențiale necesare pentru replicarea lor [13].

Cu toate progresele obținute în aplicarea tehnicilor microscopice și a studiilor de biologie celulară și moleculară, înțelegerea reorganizării organitelor celulare în cazul infecțiilor virale nu este pe deplin cunoscută. Lucrarea de față are drept scop analiza sumativă pentru diferite sisteme citopatice a rezultatelor studiilor ultrastructurale privind celulele plantelor de tomate infectate cu virusuri.

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost realizate pe plante de tomate infectate mecanic cu extract vegetal proaspăt obținut din plante infectate cu agenți virali, identificați prin metode de diagnostic (metoda contrastării negative, metoda imunosorbentă).

Pentru studierea aspectelor citopatice au fost utilizate genotipuri de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) reprezentate prin soiurile susceptibile Fakel, Nistru, Prizior, Elvira, soiurile deținătoare de gene de rezistență la VMT: Craigella (Tm-2²/Tm-2²) și Craigella (Tm-1/Tm1), specia *S. pimpinellifolium* L. și varietatea *S. pimpinellifolium* var. *racemigerum*. Plantele au fost infectate în faza de 3-4 frunzulițe cu virusurile aspermiei tomatelor (VAT), mozaicului tutunului (VMT) sau X al cartofului (VXC). Identificarea plantelor bolnave a fost realizată prin metoda contrastării negative la 10-15 zile după infectarea mecanică. În studiile ulterioare au fost utilizate numai plantele depistate purtătoare de germeni virali.

Pentru evaluarea ultrastructurii celulelor plantelor sănătoase și ale celor infectate cu virusuri a fost aplicată tehnica microscopiei electronice prin transmisie. În acest scop, fragmente de țesuturi vegetale (limb foliar, antere) au fost fixate în aldehidă glutarică de 2 % timp de 4 ore și postfixate în soluție de tetraoxid de osmiu de 2 % pe durata a 2 ore; după deshidratare în soluții de etanol în concentrație crescândă piesele au fost plasate în soluție de oxid de propilenă. Deshidratarea a fost urmată de impregnarea în amestecul de oxid de propilenă și rășini epoxidice în raportul 3:1, 1:1 și 1:3. Incluziunea a fost realizată în amestecul de rășini epoxidice (DDSA, MNA și Epon 812). Secțiunile ultrafine, obținute la ultramicrotomul UMTP-4 (Sumi, Ucraina) și LKB UM III (Suedia), au fost contrastate în soluție de acetat de uraniu și citrat de plumb, ulterior examinate în microscopul electronic prin transmisie EM 125K și JEM 100SX.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La infectarea plantelor de tomate genotipurile ce au prezentat susceptibilitate la virusurile analizate (soiurile Fanel, Nistru, Prizior, Elvira) au expus simptome exterioare de boală cu un grad variat de deformare a limbului frunzelor și a componentelor organelor reproductive în funcție de agresivitatea virusului și reacția genotipului. Prin analiza ultrastructurală, au fost detectați virioni în citoplasma celulelor mezofilului, separelor, peretelui anterelor, ultimele prezentând un nivel mai intens de concentrare a particulelor virale (Figura 1). Incidența particulelor virale în interiorul celulelor infectate a fost diferită. În cazul infectării cu VAT, virionii erau vizualizați în apropierea sau chiar în matricea plastidelor. Localizarea virusurilor în interiorul organitelor este o dovadă a supoziției, potrivit căreia agenții din genul *Cucumovirus* utilizează membranele tilacoidale în replicarea genomului viral și matricea plastidiană în asamblarea particulelor [8; 10].

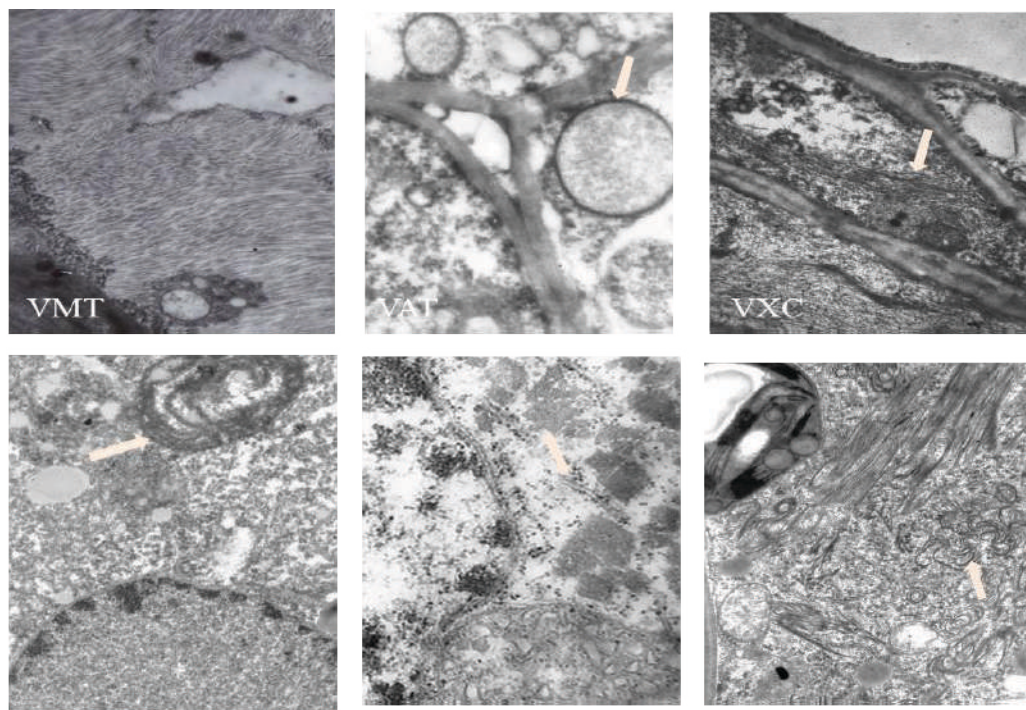


Figura 1. Structuri specifice induse de infecțiile virale în sistemele virus-gază la tomate.

Este important de precizat că conglomerări ale particulelor virale în plastide au fost vizualizate la genotipurile susceptibile, dar și cu toleranță, precum formele spontane, ultimele păstrând integritatea morfostructurală. Complementar particulelor virale în celulele infectate, cu o frecvență mai mare în țesutul tapetal și în endoteciu comparativ cu celulele mezofilului, erau atestate structuri precum agregatele cristaloi-

de specifice VAT, incluziuni concentrice membranare, *Pinwheels*, caracteristice VXC, structuri considerate drept suport pentru fixarea complexului reproductiv viral [7].

Analiza comparativă a celulelor plantelor infectate a scos în evidență acumulări ale structurilor de tip mielină (formațiuni concentrice membranare) stabilite în cantități sporite în cazul VAT față de VXC și VMT. Conform unor date din literatură, unitățile membranare nu sunt considerate structuri specifice infecției virale în contextul în care sunt atestate și în celulele sănătoase, precum și în condiții de stres cauzate de alți factori [4]. Se consideră că aceste formațiuni provin din membranele reticulului endoplasmatic și dețin un rol major în detoxifierea celulelor. Este important de menționat că elementele mielinice formate în cazul infecțiilor virale sunt mult mai abundente și au o structură multipartită comparativ cu celulele sănătoase [9]. Structurile membranare induse de virusuri sunt labile, însușire necesară pentru a asigura transportul ARN-ului viral de la *site*-urile de sinteză la plasmodesme pentru realizarea transportului de la celulă la celulă. Potrivit autorilor, asocierea complexelor de replicare a virusurilor cu membranele intracelulare și cu traficul intercelular al particulelor explică inducerea rapidă și intensă a formării structurilor membranare în cazul infecțiilor virale.

Modificările structurale descrise în patosistemele create dintre tomate și VMT, VXC sau VAT au prezentat trăsături similare, fiind remarcate deosebiri în gradul de expresie a reorganizărilor. Organitele sistemului energetic, mitocondriile și plastidele, au expus reliefări mai puternice la soiul susceptibil Elvira, comparativ cu specia *S. pimpinellifolium* sau varietatea *S. racemigerum*. În celulele mezofilului, endotecului și tapetumului ale plantelor infectate cu VMT, VXC, VAT nucleolele au prezentat redistribuiri și modificări în gradul de compactizare a cromatinei, cu prevalarea heterocromatinei perimembranare, zonă în care sunt distribuite secvențele telomerice și centromerice, iar sporirea gradului de condensare denotă o diminuare a activității nucleului. În special la soiurile Fakel și Elvira nucleolii dețineau o structură compactă, ce reprezintă, de asemenea, un indice al reprimării proceselor de sinteză a precursorilor ARN ribozomali. La specia *S. pimpinellifolium* se atestau nucleoli de tip nucleolar, precum și o compactizare mai redusă a cromatinei, ceea ce demonstrează o activitate transcripțională ridicată. În celulele acestui sistem citopatic a fost remarcat și un număr de mitocondrii cu structură normală comparativ mai mare față de celulele soiurilor infectate cu același virus. Conform concepțiilor clasice ale biologiei celulare, este acceptat că gradul de condensare a cromatinei indică nivelul activității transcripționale, cunoscând că cromatina condensată nu este accesibilă pentru factorii transcripționali [3]. Toate procesele celulare depind de expresia sau reprimarea diferitelor gene la anumite etape ontogenetice și stări funcționale. Chiar și o divergență mică în procesul de transcripție poate duce la defecte sau inducerea morții programate celulare [5]. S-a ipotetizat că genele din proximitatea regiunilor condensate ale heterocromatinei influențează expresia lor, astfel cromatina condensată reprezentând compartimente de silențiere.

Organitele sistemului vacuolar (aparatură Golgi, reticulul endoplasmatic, lizozomii, precum și vacuomul) au expus un grad diferit de reorganizare, cu aprofundarea restruc-

turărilor la soiurile susceptibile (Fachel, Elvira) și un nivel mai redus la genotipurile spontane (*S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum*) (Figura 2). În cadrul aceleiași celule erau atestate organite cu diferit grad de expresie a modificărilor structurale: fragmentarea cisternelor reticulului endoplasmatic, pierderea ribozomilor, precum și canalicule morfologic normale cu ribozomi atașați.

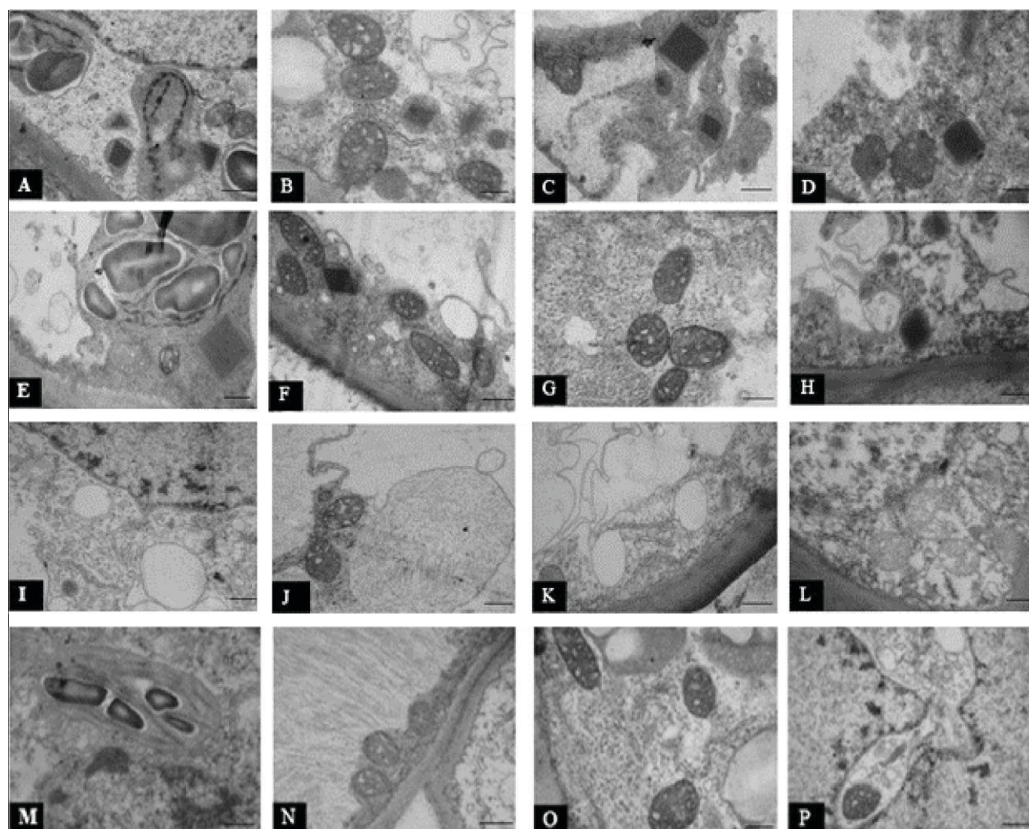


Figura 2. Expresii ultrastructurale ale organitelor celulelor mezofilului la infectarea cu virusuri a genotipurilor de tomate cu diferită reactivitate: s. Craigella (Tm-1/Tm-1) (A-D); s. Craigella (Tm-2²/Tm-2²) (E-H), s. Elvira (I-L), *S. pimpinellifolium* (M-P) în conformitate cu variantele martor (A, E, I, M), plante infectate cu VMT (B, F, J, N) și VAT (C, D, G, H, K, L, O, P) (scara barei 0,8 μm).

În cazul soiurilor cu gene de rezistență, la infectarea cu VMT, structura internă și organizarea ultrastructurală a suportat modificări mai puțin apreciable: plastidele și mitocondriile au prezentat aspecte tipice martorului, normal dezvoltate, precum și un număr sporit de peroxizomi (Figura 2 B, F). Tendințe similare au fost puse în evidență în mezofilul soiurilor Craigella (Tm-1/Tm-1) și Craigella (Tm-2²/Tm-2²) infectate cu VAT.

Aceste sisteme s-au evidențiat la nivel intracelular prin prezența unui număr major al mitocondriilor și peroxizomilor, fapt ce atestă o reacție de apărare la factori de diferită natură, cuplați cu intensificarea proceselor de detoxifiere. Menținerea integrității structurale a fost descrisă în celulele mezofilului varietăților *S. pimpinellifolium*, infectate cu VMT sau VAT (Figura 2 N, O). Aparatul nuclear a prezentat un aspect eutrofic și invaginări nesemnificative ale membranei nucleare, care denotă activarea traficului nucleo-citoplasmatic. În celulele s. Elvira, caracterizate prin susceptibilitate față de VMT și VAT, s-a atestat un grad accentuat de reorganizare a structurii interne: vacuolizarea reticulului endoplasmatic, reducerea cristelor și destrucția matricei mitocondriale (Figura 2 J-L). În sistemele gazdă-patogen analizate s-a stabilit că reorganizările intracelulare corelează cu gradul de manifestare a simptomelor bolii.

Tabloul ultrastructural identificat în sistemele citopatice analizate este o reflecție a reacțiilor concurenționale dintre metabolismul propriu al celulei și cel de reprogramare în susținerea reproducerii componentelor virali. Aspectele morfologice vizualizate sunt o dovadă a capacității majore de menținere a integrității structurale la formele spontane (*S. pimpinellifolium* și *S. racemigerum*). Soiurile susceptibile (Fakel, Elvira) au prezentat vulnerabilitate la viroze cu menținerea capacității de asigurare a proceselor productive ale infecțiilor virale.

Similar celulelor mezofilului, în endoteciul în condițiile patogenezei virale se atestă acumularea excesivă a peroxizomilor. Prezența într-un număr mai mare a acestor organite în țesuturile lipsite de fotosinteză este legată de sporirea funcțiilor de oxidare și detoxifiere.

Generalizând rezultatele analizei ultrastructurale a celulelor mezofilului și endoteciului, țesutului tapetal al plantelor infectate cu virusuri, putem scoate în evidență caracterul specific al modificărilor cauzate, gradul cărora este influențat de reacția gazdei la patogen. Reorganizările structurale ale celulelor țesuturilor ce asigură proliferarea virionilor (celulele mezofilului, tapetumului și endoteciului) au prezentat la nivelul organitelor celulare modificări cu grad eterogen de reliefare.

În toate sistemele citopatice analizate a fost stabilită o eterogenitate a gradului de expresie a modificărilor în cadrul aceluiași țesut, precum și în celulă. Gradul de reorganizare a fost mai accentuat la genotipurile cu susceptibilitate comparativ cu varietățile spontane, având un spectru similar al restructurărilor. Genotipurile tolerante s-au distins prin sporirea numărului de peroxizomi, menținerea integrității organitelor sistemului energetic (mitocondriilor și plastidelor) și deținerea unui număr mai mare de acumulări ale compușilor fenolici.

CONCLUZII

Răspunsul plantelor la infecțiile virale la nivel ultrastructural se exprimă prin reorganizări cu caracter specific (asociat replicării și localizării virionilor virali), care pot servi drept criteriu pentru detectarea patogenului, și nespecific, manifestat în baza principiilor restructurărilor tipice descrise pentru condiții de senescență, factori abiotici.

Evaluarea ultrastructurii celulelor mezofilului, endoteciului plantelor de tomate infectate cu VAT, VXC, VMT a pus în evidență în citoplasma celulelor infectate prezența particulelor virale, precum și a incluziunilor intracelulare specifice (structurilor membrana-re concentrice *Pinwheels*, formațiunilor cristaloid), ceea ce reprezintă reacții specifice. La soiurile sensibile de tomate s-a stabilit o acumulare sporită a germenilor virali în țesuturile sterile ale anterei comparativ cu celulele mezofilului.

Studiile ultrastructurale oferă date importante privitor la reorganizările structurale ale celulelor țesuturilor ce asigură proliferarea virionilor (celulelor mezofilului, stratum tapetal și endoteciului). Modificările citopatice induse la nivelul organitelor celulare poartă un caracter stereotipic, manifestând eterogenitate a gradului de expresie în cadrul unei celule, precum și a celulelor aceluiași țesut.

Bibliografie:

1. ANAND, S. K., TIKOO, S. K. Viruses as modulators of mitochondrial functions. In: *Adv Virol*, 2013, p.1-17.
2. GLINGSTON, R. S., DEB, R., KUMAR, S., NAGOTU, S. Organelle dynamics and viral infections: at cross roads. In: *Microbes and Infection*, 2019, vol. 21(1), p. 20-32.
3. GUO, T., FANG, Y. Functional organization and dynamics of the cell nucleus. In: *Front Plant Sci*, 2014, vol. 5, p. 1-12.
4. HULL, R. Plant viruses. 5th edition. John Innes Centre, Norwich, UK, 2014. 918 p.
5. JOST, L. K., BERTULAT, B., CARDOSO, C. M. Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? In: *Chromosoma*, 2012, vol. 121 (6), p. 555-563.
6. KAGAN, J. C. Signaling organelles of the innate immune system. In: *Cell*, 2012, vol. 151, p. 1168-1178.
7. KOPEK, B. G., PERKINS, G., MILLER, D. J. Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle. In: *PLoS Biol.* 2007, 5: e220.
8. LALIBERTE, J. F., SANFACON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. In: *Annu Rev Phytopathol*, 2010, vol. 48, p. 69-91.
9. LALIBERTE, J-F., ZHENG, H. Viral manipulation of plant host membranes. In: *Annual Review of Virology*, 2014, vol. 1, p. 237-259.
10. LYLES, D. S. Cytopathogenesis and inhibition of host gene expression by RNA viruses. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64 (4), p. 709-724.
11. NOVOA, R.R., CALDERITA, G., ARRANZ, R. et al. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. In: *J Cell Biol*, 2005, vol. 97, p. 147-172.

12. PFEIFFER, P., HOHN, T. Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: A detailed model and test of some aspects. In: *Cell*, 1983, vol. 33, p. 781-789.
13. ROMERO-BREY, I., BARTENSCHLAGER, R. Endoplasmic reticulum: the favorite intracellular niche for viral replication and assembly. In: *Viruses*, 2016, vol. 8, p. 160.
14. ZAKARYAN, H., STAMMINGER, T. Nuclear remodelling during viral infections. In: *Cell Microbiol*, 2011, vol. 13, p. 806-813.