

FRANCO FAORO e RENATA TORNAGHI

Gruppo Virus e Virosi delle Piante del C.N.R., Unità di Ricerca di  
Milano, c/o Istituto di Patologia Vegetale dell'Università - Milano

ALTERAZIONI CITOLOGICHE IN PIANTE DI *Nicotiana tabacum* L.  
INFETTE DA "TOBACCO MOTTLÉ VIRUS".

La maculatura del tabacco, meglio conosciuta come "tobacco mottlé", è una malattia considerata ad eziologia virale sia per la sua sintomatologia che per le modalità di trasmissione ed altre caratteristiche del patogeno, il "tobacco mottlé virus" (1,2). Tale virus tuttavia, nonostante vari tentativi, non si è mai potuto osservare al microscopio elettronico in tessuti infetti, nè si è potuto da questi purificare con le normali tecniche impiegate in virologia (3). L'infezione da "tobacco mottlé virus" si presenta come una lieve maculatura della lamina fogliare in forma di chiazze di un verde leggermente più scuro rispetto al normale colore della foglia. Poichè le piante sopravvivono molto bene all'infezione, l'importanza del "tobacco mottlé" è dovuta principalmente al fatto che in natura l'agente patogeno è di solito associato ad un altro virus, il "tobacco vein-distorting", insieme a cui produce una severa sintomatologia detta "rosetta del tabacco" per la tipica conformazione assunta dalle piante infette (1,2). Anche il "tobacco vein-distorting virus", al pari del "mottlé", non è stato tuttavia mai osservato al microscopio elettronico nè si è potuto isolarlo da tessuti infetti (3) ed è considerato un virus perchè trasmesso in modo persistente dall'afide *Myzus persicae* e perchè la sintomatologia prodotta nell'ospite è simile a quella di altre infezioni da virus (4).

Nel tentativo di chiarire questo complesso quadro eziologico, anche alla luce delle più recenti acquisizioni sulla citopatologia delle infezioni da virus, è stato da noi intrapreso uno studio ultrastrutturale

su tessuti di tabacco sia infetti separatamente dal "mottle virus" e dal "vein-distorting virus", sia infetti congiuntamente con i due e presentanti quindi sintomi di rosetta. Mentre le osservazioni effettuate in quest'ultimo caso sono già state rese note (5), riporteremo qui di seguito i risultati dell'indagine ultrastrutturale effettuata su tessuti di tabacco infetti dal solo "tobacco mottle virus".

#### MATERIALI E METODI

L'isolato di "tobacco mottle virus" usato in questi studi è quello originariamente descritto da SMITH (1) e che è mantenuto in coltura presso il John Innes Institute di Norwich - England dove il lavoro di infezione delle piante e di inclusione dei preparati è stato svolto, in accordo con "Ministry of Agriculture and Fisheries, Licence 4410912/169, issued under the Destructive Pests and Diseases of Plants order, 1965, U.K."

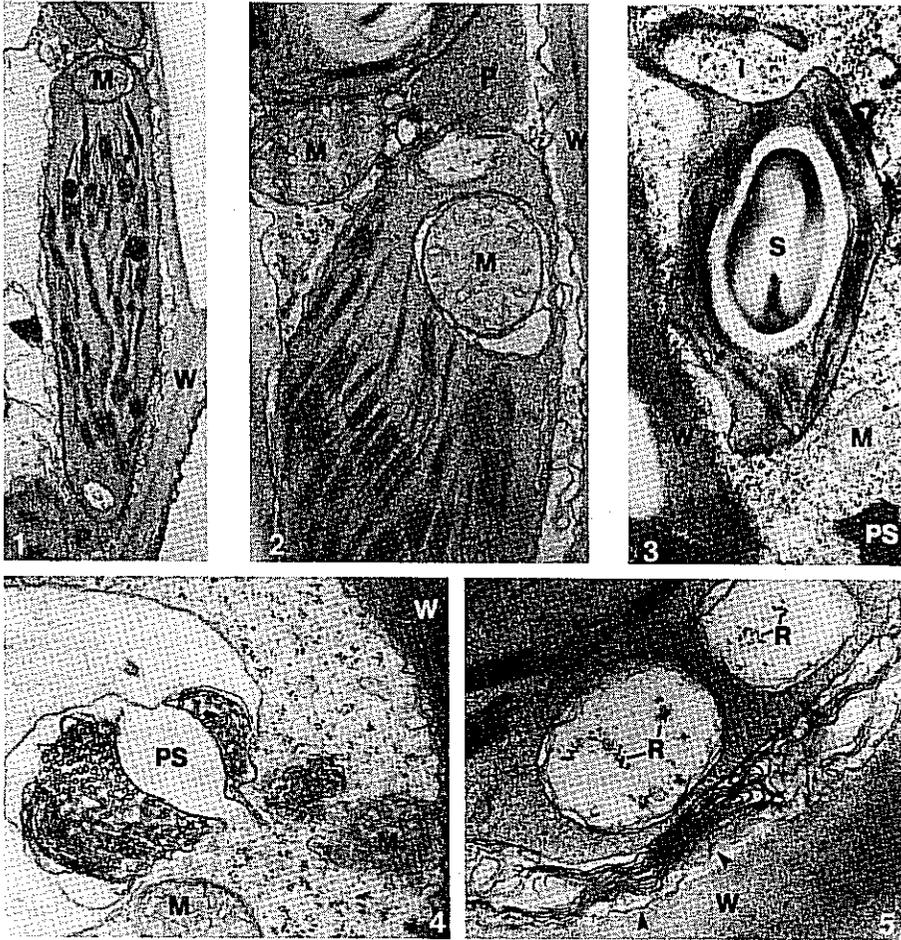
Giovani piante di Nicotiana tabacum L., cv. White Burley, sono state inoculate meccanicamente con omogenato di foglie provenienti da piante infette dal complesso della rosetta. In tal modo veniva trasmesso solo il componente "mottle" e non il "vein-distorting" che è invece trasmissibile esclusivamente per mezzo del M. persicae (2). Campioni dei vari tessuti fogliari sono stati prelevati dalle piante a 10 giorni dall'inoculazione, quando comparivano i primi sintomi di maculatura, e a 1 e 2 mesi quando la sintomatologia rimaneva stazionaria. Tali campioni erano fissati, inclusi, sezionati e contrastati per l'esame al microscopio elettronico seguendo la metodologia standard precedentemente descritta (5). In parallelo erano inclusi ed esaminati come controllo anche campioni di foglie da piante sane della stessa età ed allevate alle medesime condizioni di luce, temperatura ed umidità.

## RISULTATI

L'esame al microscopio elettronico delle sezioni ultrasottili non ha evidenziato la presenza di particelle virali nè nel sistema vascolare, nè nel parenchima clorofilliano o nell'epidermide delle foglie di tabacco infettate dal "tobacco' mottle virus", qualsiasi fosse il tempo intercorso tra l'inoculazione ed il prelievo dei campioni. Tuttavia, mentre nel floema e nello xilema erano apparentemente assenti anche alterazioni ultrastrutturali di qualsiasi tipo, nel parenchima clorofilliano è stata notata la presenza di vacuoli alla periferia dei cloroplasti e si sono osservate alcune anomalie a carico del plasmalemma.

I vacuoli avevano una doppia membrana e contenevano materiale citoplasmatico e ribosomi e, talvolta, un mitocondrio (Figg. 1,2,3,5). Dallo studio delle sezioni seriali si è constatato che in realtà questi vacuoli non sono altro che invaginazioni citoplasmatiche e che tali invaginazioni sono localizzate esclusivamente alla periferia dei cloroplasti, preferibilmente ai due poli dell'organulo ed in numero massimo di due (Figg. 1-3). A dieci giorni dall'inoculazione il numero dei cloroplasti presentanti invaginazioni variava dal 30 al 50%, di cui circa il 10% conteneva un mitocondrio. Ad un mese e a due mesi dall'inoculazione la percentuale di cloroplasti con invaginazioni rimaneva più o meno costante ma solo raramente in queste invaginazioni erano visibili dei mitocondri. La struttura dei cloroplasti non aveva subito altre variazioni degne di nota, a parte il contenuto di amido. Grossi granuli di amido erano visibili infatti in tutti i cloroplasti con invaginazioni e mai in quelli in cui nelle invaginazioni c'erano i mitocondri. La quantità di amido nei cloroplasti con invaginazioni senza mitocondri era in genere decisamente superiore a quella contenuta nei cloroplasti dei controlli sani.

Riguardo le alterazioni a carico del plasmalemma, queste consistevano principalmente nella formazione di stratificazioni multiple di membrane a ridosso del plasmalemma stesso (Fig.5) e nella presenza di plasmalemmasomi (Fig.4). Ambedue i fenomeni erano tuttavia osserva-



Figg.1-5. Sezioni ultrasottili di cellule del parenchima clorofilliano di foglie di tabacco infette da "tabacco mottle virus"; M=mitochondrio, P=perossisoma, PS=plasmalemmasoma, S=amido, W=parete cellulare.

Fig.1. Cloroplasto presentante ai due poli invaginazioni citoplasmatiche, una delle quali contiene un mitocondrio; x8.000.

Fig.2. Particolare di un mitocondrio invaginato nel cloroplasto; notare lo stretto contatto tra le membrane dei due organelli; x20.000.

Fig.3. Cloroplasto dopo che il mitocondrio è stato rilasciato. Il piano della sezione è tangenziale all'invaginazione (I) che nelle Figg. 1, 2, 5 compare invece tagliata trasversalmente e si presenta come un vacuolo. Nota anche il grosso granulo di amido nel cloroplasto; x16.000.

Fig.4. Plasmalemmasoma formatosi dal tonoplasto nel vacuolo; x30.000.

Fig.5. Strati multipli di membrane plasmalemma-simili associate alla membrana plasmatica (frecche). Nell'adiacente cloroplasto sono presenti due invaginazioni contenenti citoplasma e ribosomi (R); x30.000

ti con una maggior frequenza in cellule con cloroplasti presentanti invaginazioni.

#### DISCUSSIONE

La presenza di invaginazioni citoplasmatiche contenenti mitocondri nei cloroplasti è già stata segnalata in diversi casi di infezioni da virus (6,7,8,9) ma si è sempre trattato, a detta degli stessi Autori, di un fenomeno occasionale e comunque non quantizzabile come nel caso della maculatura del tabacco. Secondo studi effettuati da MONTES e BRAD-BEER su Zea mays e Hyptis suaveolens (10) e da WILDMAN e collaboratori su Nicotiana excelsior (11) la formazione nei cloroplasti di invaginazioni contenenti mitocondri è la conseguenza della necessità di un più stretto contatto tra i due organelli in condizioni di stress quali ad esempio la scarsa luminosità o il buio. Quando infatti si ripristinano le condizioni normali di luce i mitocondri vengono rilasciati e nel cloroplasto rimane l'invaginazione.

E' probabile che anche nel nostro caso, pur essendo diversa la causa dello stress, il fenomeno si verifichi per permettere un maggior contatto tra i due organelli e quindi un maggior scambio di enzimi e/o metaboliti. D'altra parte, il fatto che troviamo mitocondri nei cloroplasti esclusivamente alla comparsa dei sintomi, cioè quando presumibilmente è in corso la fase acuta del processo infettivo, e non più tardi di quando è stato raggiunto un equilibrio tra patogeno e cellule dell'ospite, potrebbe dar credito a questa ipotesi.

Il fenomeno dell'invaginazione di mitocondri nei cloroplasti è stato evidenziato anche in condizioni fisiologiche normali in diverse specie della famiglia delle Araceae (12) tanto da essere considerato un aspetto ultrastrutturale tipico per quelle specie. E' tuttavia interessante notare che anche in questi casi il fenomeno diventa notevolmente più frequente quando le cellule sono senescenti e quindi con metabolismo in qualche modo alterato.

Per quanto riguarda invece la presenza di grossi granuli di ami-

do da noi rilevata nei cloroplasti che hanno avuto interazioni con i mitocondri, questo potrebbe essere dovuto a difficoltà di solubilizzazione o di utilizzazione dello stesso amido a seguito dell'infezione, ma potrebbe essere anche la conseguenza di scambi enzimatici o metabolici avvenuti tra i due organelli (11).

L'aspetto comunque più interessante delle nostre osservazioni è stato il ritrovamento di plasmalemmasomi e stratificazioni multiple di membrane a ridosso del plasmalemma. Questo tipo di alterazioni è stato segnalato in casi di infezione da viroidi e sembra essere un effetto citopatico caratteristico di questo tipo di patogeni (13,14,15). Ciò fa pensare che l'agente eziologico della maculatura del tabacco possa essere in realtà un viroide e l'ipotesi sarebbe avvalorata dal fatto che non si è riusciti ad evidenziare nessun virus nei tessuti infetti, nè alterazioni tipiche da virus, dato che le sopradescritte invaginazioni nei cloroplasti sembrano essere una aspecifica risposta a stress.

Va infine ricordato che gli studi ultrastrutturali su tabacco infetto con il complesso della rosetta, cioè con il "mottle" ed il "vein-distorting" insieme, hanno rivelato la presenza di un unico virus - molto probabilmente il "vein-distorting" - e di alterazioni nel parenchima clorofilliano simili a quelle qui riportate (5). Questo ci sembra una ulteriore indicazione in favore dell'eziologia da viroide per la maculatura del tabacco. In tal caso, il fatto che M.persicae sia in grado di trasmettere in modo persistente anche l'agente del "mottle" quando è associato nella pianta al "vein-distorting" (2) potrebbe significare che la trasmissione dei due avviene per "phenotypic mixing", ossia per incorporazione del genoma del "mottle" nel nucleocapside del "vein-distorting virus".

## RIASSUNTO

L'esame ultrastrutturale di tessuti fogliari di tabacco infetti con il "tobacco mottle virus" non ha evidenziato la presenza di particelle virali nè di alterazioni citologiche tipiche da virus. Sono state invece riscontrate invaginazioni citoplasmatiche, talvolta contenenti un mi-

tocondrio, nei cloroplasti del parenchima clorofilliano ed anomalie a carico della membrana citoplasmatica. Tali anomalie consistevano soprattutto nella formazione di stratificazioni multiple di membrane plasmalemma-simili e nella presenza di plasmalemmasomi.

Mentre le invaginazioni nei cloroplasti sono probabilmente una risposta aspecifica allo stress causato dall'infezione, le alterazioni a carico della membrana citoplasmatica sono le stesse già osservate in diverse infezioni da viroidi e considerate tipiche di questo gruppo di patogeni. Per tale motivo ed in considerazione del fatto che non si è potuto evidenziare particelle virali o virus-simili nelle foglie di tabacco infettate da "tobacco mottle virus" si avanza l'ipotesi che l'agente di questa malattia sia in realtà un viroide.

#### SUMMARY

CYTOLOGICAL ALTERATIONS IN Nicotiana tabacum L. PLANTS INFECTED WITH TOBACCO MOTTLE VIRUS. - An extensive search of all types of tissue from tobacco leaves infected with tobacco mottle virus did not reveal the presence of either virus-like particles or ultrastructural alterations characteristic for some virus groups. However containing-mitochondria invaginations into chloroplasts and some abnormalities associated with the plasma membrane were observed in chlorenchyma cells. These abnormalities consisted in the presence of plasmalemmasomes and multiple layers of plasma-like membrane. While invaginations into chloroplasts could be interpreted as a non-specific response to the infection, abnormalities of plasma membrane had already been observed in several viroid infections and are considered a typical ultrastructural alteration caused by these pathogenes. For this reason and because of the impossibility of observing virus-like particles in the tobacco mottle-infected tissues, it has been suggested that the causal agent of this disease could be a viroid.

BIBLIOGRAFIA

- 1) SMITH K.M.(1946a). Tobacco rosette: a complex virus disease. Parasitology 37, 21-24.
- 2) SMITH K.M.(1946b). Transmission of a plant virus complex by aphids. Parasitology 37, 131-134.
- 3) SMITH K.M., RITCHIE D.A.(1980). Introduction to Virology. Chapman and Hall, London.
- 4) SHEPHERD R.J., FRANCKI R.I.B., HIRTH L.K., HOLLINGS M., INOUE T., MACLEOD R., PURCIFULL D.E., SINHA R.C., TREMAINE J.H., VALENTA V., VETTER C.(1976). New groups of plant viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses, Sept. 1975. Intervirology 6, 181-184.
- 5) FAORO F., SHORT M.N., TORNAGHI R.(1982). Tobacco rosette disease: an ultra-structural study. Micron 13, 399-407.
- 6) SHALLA T.A.(1964). Assembly and aggregation of tobacco mosaic virus in tomato leaflets. J.Cell Biol. 21, 253-264.
- 7) GEROLA F.M.(1967). Ultrastruttura delle virosi nei vegetali. Atti X Congresso Soc.Ital.Patologia, 311-347.
- 8) KIM K.S., FULTON J.P.(1969). Electron microscopy of pokeweed leaf cells infected with pokeweed mosaic virus. Virology 37, 297-308.
- 9) FAVALI M.A., CONTI G.G.(1970). Ultrastructural observations of the chloroplasts of basil plants either infected with different viruses or treated with 3-amino-1,2,4-triazole. Protoplasma 70, 153-166.
- 10) MONTES G., BRADBEER J.W.(1976). An association of chloroplasts and mitochondria in Zea mays and Hyptis suaveolens. Plant Sci.Lett. 6, 35-41.
- 11) WILDMAN S.G., JOPE C., ATCHISON B.A.(1974). Role of mitochondria in the origin of chloroplast starch grains. Plant Physiol. 54, 231-7.
- 12) MORASSI BONZI L., FABBRI F.(1976). On the occurrence of chloroplast protrusions in some Araceae. Giornale Botanico Ital.110, 462-63.
- 13) SEMANCIK, J.S., VANDERWOUDE W. (1976). Exocortis Viroid cytopathic effects on the plasma membrane in association with pathogenic RNA. Virology 69, 719-726.
- 14) ROSENBERG-GOMEZ F., WAHN K., SANGER H.L.(1978). Cytopathic changes in viroid infected plant tissue. Proc. IVth Int.Congress of Virology. The Hague, The Netherlands, 664 pp.
- 15) HARI V. (1980). Ultrastructure of potato spindle tuber viroid-infected tomato leaf tissue. Phytopathology 70, 385-387.