

ANNA RUDZIŃSKA-LANGWALD
GRAŻYNA GARBACZEWSKA

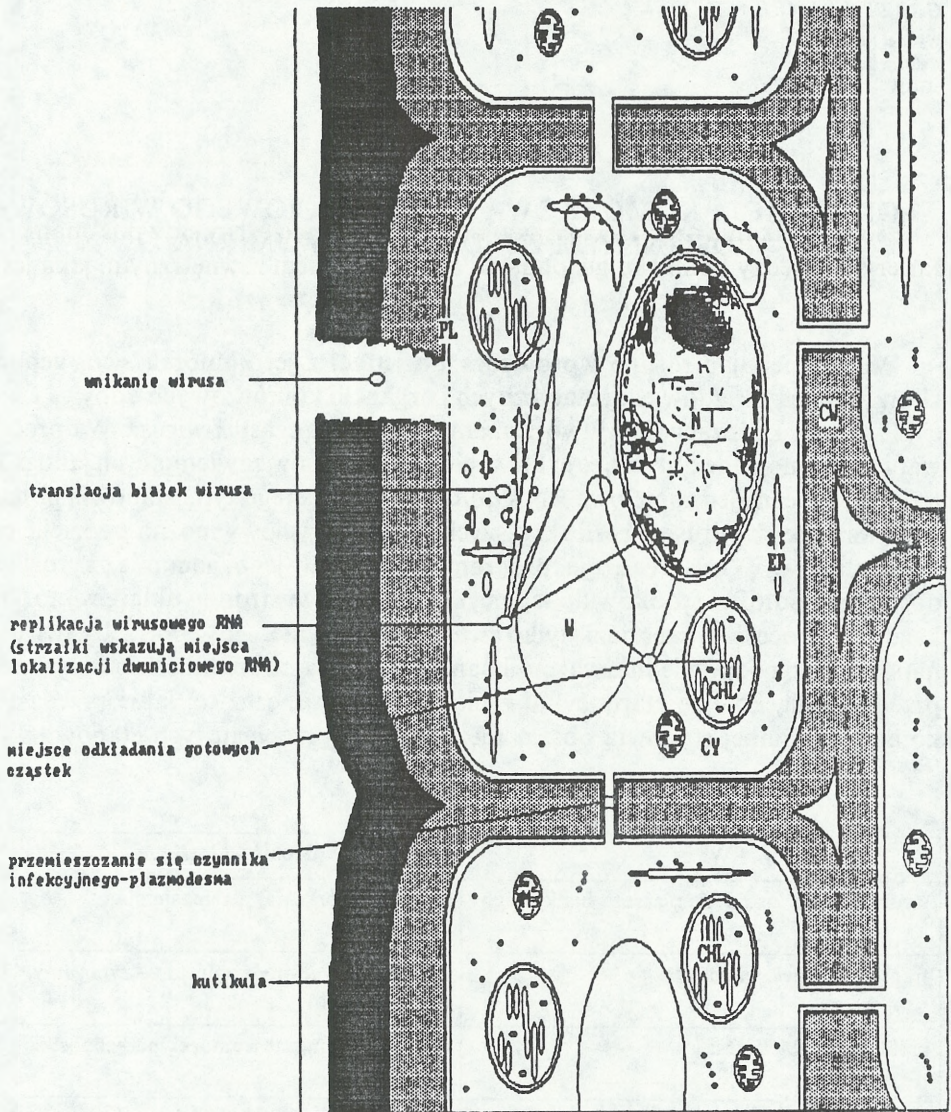
Wydział Rolniczy
 Katedra Botaniki
 SGGW
 Warszawa

LOKALIZACJA KOMÓRKOWA CYKLU ŻYCIOWEGO WIRUSÓW ROŚLINNYCH Z JEDNONICIOWYM RNA

Wirus infekując roślinę wprowadza do jednej z jej komórek swój genom i korzystając z układów enzymatycznych i organelli komórkowych odbywa swój cykl życiowy kończący się wytworzeniem potomnych cząstek wirusa. W opracowaniu zebrano dane dotyczące cyklu życiowego wirusów zawierających jako materiał genetyczny jednoniciowe RNA (ssRNA). Wirusy tego typu stanowią ponad 75% wszystkich wirusów roślin wyższych. Ich cykl życiowy można podzielić na kilka etapów. Wirus realizuje program zawarty w jego genomie, a roślina dostarcza podłoża i środków do tego cyklu. Jest to dwustronny układ, w którym każdy z procesów zachodzi tylko wtedy efektywnie, gdy potrzeby wirusa napotykają na odpowiednie warunki danej rośliny. Poniższa tabela oraz rysunek przedstawiają kolejne etapy cyklu życiowego wirusa, oraz to, jakie przedziały komórki roślinnej stanowią obszar niezbędny do przebiegu tych etapów

Wirus	Komórka roślinna
wejście wirusa, usunięcie płaszcza białkowego	ściana komórkowa, plazmalemma i cytoplazma
translacja białek wirusa	system translacyjny komórki — rybosomy, enzymy, tRNA
replikacja RNA wirusa	struktury błoniaste komórki, podjednostki polimerazy
odłożenie gotowych cząstek oraz białek kodowanych przez genom wirusa i stanowiących inkluzje	miejsce gromadzenia cząstek — cytoplazma, wakuola, jądro, mitochondria, chloroplasty
przemieszczanie się czynnika infekcyjnego do innych komórek	struktury umożliwiające transport — plazmodesmy

Lokalizacja cyklu życiowego wirusów roślin z jednoniciowym RNA



CHL - chloroplast
 CM - ściana komórkowa
 CY - cytoplazma
 ER - retikulum endoplazmatyczne

M - mitochondrium
 N - jądro
 PL - plazmalemma
 W - wakuola

Poszczególne procesy związane z replikacją wirusa przystosowują metabolizm komórki do potrzeb cyklu życiowego wirusa. Wynikiem tego jest powstanie wtrątw obcych białek w protoplaście oraz modyfikacja struktur komórkowych. Suma tych zjawisk przyczynia się do uruchomienia reakcji autoregulacyjnych i obronnych. Ta część reakcji rośliny została pominięta w powyższym opracowaniu.

WNIKANIE GENOMU WIRUSA DO KOMÓREK ROŚLINY GOSPODARZA

Proces wnikania cząstki wirusa do komórki roślinnej łączy się z pokonaniem bariery pomiędzy komórką gospodarza a środowiskiem zewnętrznym, jaką jest ściana komórkowa. Z racji specyfiki budowy roślin, przy rozprzestrzenianiu się infekcji z komórki do komórki w obrębie jednej rośliny wirusy napotykać na zupełnie inne uwarunkowania niż przy pierwotnym wnikaniu do rośliny. Przez proces wnikania genomu wirusa rozumiemy te zjawiska, które związane są z pierwotną infekcją rośliny i zachodzą w trakcie cyklu życiowego wirusa w pojedynczym osobniku rośliny tylko jeden raz. Stanowi to zasadniczą różnicę w sposobie infekcji wirus—roślina, w odróżnieniu od relacji wirus—zwierzę lub bakteriofag—bakteria, gdzie wniknięcie do każdej następnej komórki łączy się z powtarzającymi się procesami forsowania barier otaczających te komórki.

Wirusy roślin mogą być wprowadzane do komórek przez: 1) adsorbcję na powierzchni liścia (inokulacja mechaniczna); 2) owady posiadające zarówno aparat gębowy ssący jak i gryzący; 3) nicienie; 4) grzyby; 5) kianankę; 6) szczepienie oraz 7) przez pyłek i nasiona.

Jednym z najbardziej kontrowersyjnych problemów związanych z wnikaniem wirusa do komórek roślin jest zagadnienie, co właściwie dostaje się do cytoplazmy — cała cząstka wirusa, czy też tylko sam kwas nukleinowy.

Jeżeli do cytoplazmy wnika tylko RNA wirusa, to usunięcie białek wirionu musi się odbywać poza protoplastem komórek. Proponowanymi miejscami odbiałczania RNA jest ściana komórkowa lub plazmolema. Wiązania hydrofobowe są związane z oddzieleniem wirusowego RNA od płaszcza białkowego *in vitro*. W komórce właśnie takimi hydrofobowymi miejscami mogą się okazać tłuszczowce kutikuli i/lub fosfolipidy plazmolemy. Hipoteza ta stała się szczególnie atrakcyjna w momencie, gdy stwierdzono, że wirusy pałeczkowate jednym końcem przyłączają się do kutikuli ściany komórkowej [27, 54]. S h a w [60, 61] stwierdził, że proces oddzielania białek płaszcza cząstki wirusa mozaiki tytoniu (tobacco mosaic virus) odbywający się na kutikuli jest procesem dwustopniowym. Pierwszy etap jest biofizyczny, a dalsze są czułe na temperaturę i są związane z działaniem enzymów. Niestety K u r t z - F r i s c h i H i r t h [42] nie stwierdzili drugiego, wrażliwego na temperaturę etapu dla wirusów poliheдрыcznych.

Obserwowano przyłączanie się wirionów również do powierzchni ściany komórkowej w przestrzeniach międzykomórkowych miększu asymilacyjnego [25]. W tego typu ścianach nie stwierdza się lipidów. Teren ten stanowi apoplast dostępny dla dyfuzji wody, a więc nie ma właściwości hydrofobowych.

Po oddzieleniu cząsteczki RNA od płaszczka białek kapsydu pozostaje konieczność przedostania się nagiego RNA przez znaczne obszary ściany komórkowej, co wydaje się procesem dość trudnym. Wprawdzie w zewnętrznych ścianach skórki występują ektodesmy — rozstępy nie zawierające żadnych utworów błoniastych ani plasmodesm, a wypełnione lipidami. Są to struktury pojawiające się i znikające w fibryllarnej konfiguracji ściany. Ze względu na swą budowę mogą stanowić kanały umożliwiające przejście wirionu lub RNA wirusa w kierunku protoplastu komórki. Proponowano je jako miejsca infekcji [5, 50, 65]. Merkens i de Zoeten (1979) nie stwierdzili cząstek wirusa X ziemniaka (potato virus X PVX) w ektodesmach ani w ścianie komórkowej, ale nie wyklucza to przemieszczania się nagiego RNA wirusowego w tych strukturach.

Innym prawdopodobnym miejscem oddzielania białek kapsydu jest plazmolema. Potwierdzają to badania nad izolowanymi fosfolipidami błon [39]. Coock i King [11] obserwowali przyłączanie się jednym końcem cząstek TMV do błon protoplastów owoców pomidora. Durngham [16] proponował, że TMV i inne wirusy mogą być odbiałczane na plazmolemie dzięki różnicy stężeń jonów wapnia pomiędzy wnętrzem komórki a otoczeniem. Poza komórką stężenie jonów wapniowych wynosi średnio 10^{-3} M jonów wapniowych, a w komórce stężenie to spada do 10^{-7} M. Wiele wirusów jest stabilizowanych tymi jonami. Zmniejszenie ich stężenia może w istotny sposób wpłynąć na rozluźnienie wiązań wewnątrzcząsteczkowych. Jednak nie wszystkie wirusy wiążą jony wapnia. Nie wydaje się więc, by zjawisko to miało charakter uniwersalny.

Wydaje się, że wnikanie wirusów roślin do komórki nie jest związane ze specjalnymi miejscami adsorpcji na plazmolemie, jak to ma miejsce przy wnikaniu RNA bakteriofagów do komórek bakterii, czy też wirusów zwierzęcych do komórek ich gospodarzy [6]. Spośród wirusów roślin zawierających w cząstce ssRNA większość ma w budowie wirionu tylko jeden rodzaj polipeptydu (z wyjątkiem grupy wirusa ostrej mozaiki grochu — pea enation mosaic virus PEMV oraz comowirusów, w których cząstkach są dwa rodzaje białka). Nie występują również ani glikolipidy, ani glikoproteidy [52], które w wypadku wirusów zwierzęcych uznane zostały za receptory, dzięki którym cząstki wirusa adsorbują się na powierzchni komórek. Powierzchnia komórek roślinnych wygląda inaczej przede wszystkim ze względu na istnienie ściany komórkowej. Po drugie, nawet jeśli istnieje glikokaliks na powierzchni plazmolemy komórek roślinnych, to nie jest on specjalnie rozbudowany [32]. W tej warstwie z kolei występują receptory komórkowe powodujące adsorpcję cząstek wirusa na powierzchni komórek zwierzęcych i bakteryjnych.

Pewnych informacji na temat wnikania wirusów dostarczają badania protoplastów komórek roślinnych. Zaobserwowano tworzenie się pęcherzyków pinocytotycznych, wewnątrz których znajdowały się cząstki wirusa. Wskazuje to na pinocytozę jako możliwą drogę wnikania cząstek wirusów do cytoplazmy [7, 11, 38, 64]. Nie wiadomo jednak jak odbywa się przejście cząstki wirusa z pęcherzyka pinocytotycznego do cytoplazmy i co się z nią dzieje w trakcie tego procesu. Wyniki te przypominają w znacznym stopniu wnikanie do komórek zwierzęcych takich małych RNA wirusów jak picornawirusy. Jednak jest to zjawisko sztuczne, ponieważ nastąpiło usunięcie ściany komórkowej, a także z powodu dodania do pożywki związku uszkadzającego plazmolemę i powodującego powstawanie pęcherzyków pinocytotycznych poly-L-ornityny (PLO). Drugą możliwą drogą wnikania cząstek wirusa do protoplastów są uszkodzenia plazmolemy pod wpływem kompleksu wirus—PLO. Tak więc wnikanie cząstek wirusów roślinnych do protoplastów jest procesem biernym, głównie związanym z fizycznymi (elektrostatycznymi) siłami pomiędzy protoplastem a cząstką wirusa i to różni ten proces w porównaniu z wnikaniem picornawirusów.

Inną możliwością jest to, że do cytoplazmy dostaje się cała cząstka wirusa. Fakt ten pozostawałby w sprzeczności ze sposobem wnikania bakteriofagów i wirusów zwierzęcych. Jednak założenie, że dochodzi do kontaktu między cytoplazmą i całą cząstką wirusa, wydaje się logiczne, jeśli traktować różne sposoby rozprzestrzeniania się wirusów jako jednolity proces. Przenoszenie wirusa przez owady, nicienie i grzyby odbywa się w swym założeniu z uszkodzeniem komórki. Istnieje szereg pośrednich dowodów sugerujących, że do cytoplazmy wnika cała cząstka wirusa. Naświetlanie ultrafioletem inaktywuje kwasy nukleinowe, gdy nie są one osłonięte białkami. Naświetlanie UV roślin inokulowanych wirusem mozaiki tytoniu TMV hamowało infekcję, dopiero gdy wykonano je w trzy godziny po inokulacji. Natomiast jeśli inokulowano rośliny samym RNA wirusa, to osiągnięto efekt hamujący infekcję przy naświetlaniu ultrafioletem bezpośrednio po inokulacji. Z drugiej strony fakt, że możliwa jest inokulacja roślin nagim RNA wirusowym znaczy, że przy procesie wnikania wirusa do komórek nie jest potrzebne białko płaszczka. Możliwe jest jednak, że białko płaszczka potrzebne jest przy dalszych etapach cyklu życiowego wirusa, odbywającego się w cytoplazmie komórek. Obecność białek płaszczka lub odcinka RNA kodującego to białko jest niezbędna do namnażania się wirusa mozaiki lucerny (alfalfa mosaic virus AMV) oraz wirusów z grupy ilarvirus. Białko to prawdopodobnie umożliwia rozpoznanie RNA tych wirusów przez polimerazę.

Interesującą hipotezę wysuwa W i l s o n [70]. Łączy ona oddzielanie białek kapsydu od wirusowego RNA z dalszymi etapami cyklu życiowego. Przy końcu 5'RNA znajduje się informacja dotycząca tworzenia się polipeptydów polimerazy RNA. Odbiałczanie cząstki (dla wirusów nitkowatych) zaczyna się od końca 5', o czym wiemy z badań *in vitro*. Gdy nienaruszona cząstka wirusa wniknie do cytoplazmy, jej proces odbiałczania zaczyna się podobnie. Powoduje to odsłonięcie odcinka RNA kodującego polimerazę, przyłączenie się do niego

rybosomów i powstanie polimerazy. W tym czasie odbywa się odbiałczanie przesuwające się do końca 3'. Gdy ten proces zostanie zakończony, polimeraza przesuwa się do końca 3', hamuje translację i zaczyna się tworzenie nici (-)RNA. Tłumaczy to fakt, że polimeraza powstaje jako jedno z białek wczesnych i że powstaje jej stosunkowo mało. *M a c h i d a i K i h o* (1970) i *K i h o* (1970 i 1972) inokulowali tytoń TMV, którego RNA był znakowany pierwiastkami radioaktywnymi. Stwierdzili, że w cytoplazmie komórek znajduje się oplaszczony RNA wirusowy. Taki niecałkowicie odbiałczony RNA przyłącza się do rybosomów osadzonych na błonach retikulum endoplazmatycznego. Jeśli inokuluje się rośliny nagim RNA wirusa, to przyłączy się on wyłącznie do wolnych rybosomów, występujących w cytoplazmie.

PRODUKCJA BIAŁEK WCZESNYCH WIRUSA

Genom wirusa po wniknięciu do komórki roślinnej i uwolnieniu z białek kapsydu działa jako matryca do produkcji białek. Koduje on 4—7 polipeptydów w zależności od wirusa. Białka otoczki powstają w końcowej fazie cyklu życiowego. Natomiast wczesnym i kluczowym białkiem dla dalszych etapów cyklu życiowego wirusa jest polimeraza RNA zależna od RNA. Indukowaną przez infekcję wirusową aktywność polimerazy stwierdzili *Z a i t l i n* i wsp. [72], *Z a b e l* i wsp. [73] i *L e R o y* i wsp. [77].

Cząsteczka polimerazy jest stosunkowo duża. Jej wielkość często przekracza pojemność informacyjną wirusowego RNA. Dlatego przypuszcza się, że tylko jeden z polipeptydów wchodzących w skład polimerazy jest kodowany przez genom wirusa, pozostałe zaś przez genom komórki [33]. Wyniki te korespondują z tym co wiemy o replikazie produkowanej przez RNA bakteriofagi, takie jak *Q β* i *MS2*. Polimeraza tych wirusów jest heterooligomerem zbudowanym z czterech podjednostek. Trzy z tych polipeptydów kodowane są przez genom bakterii, jeden przez genom wirusa. Polipeptydy kodowane przez komórkę bakterii w niezakażonych komórkach spełniają zupełnie inną rolę. Jeden z tych polipeptydów jest białkiem rybosomowym, odpowiedzialnym za rozpoznanie przez rybosomy regionów inicjalnych mRNA. Dwa pozostałe białka to czynniki elongacyjne uczestniczące przy wydłużaniu łańcucha polipeptydowego.

Polimeraza RNA wirusów roślinnych związana jest z frakcją membranową komórki. Ten związek enzymu z błonami jest również charakterystyczny dla analogicznej polimerazy produkowanej przez wirusy zwierzęce — pikornawirusy. Fakt związania polimerazy z błonami sugeruje, że polipeptydy wchodzące w jej skład i kodowane przez roślinę są białkami błon komórkowych.

Produkcja białek na matrycy wirusowego RNA odbywa się z użyciem rybosomów cytoplazmatycznych, gdyż większość tego typu translacji jest podatna na cykloheksamid, a nie podatna na chloramfenikol.

Zostało jednak udowodnione w warunkach *in vitro*, że białka otoczki TMV mogą być syntetyzowane na rybosomach 70S pochodzących zarówno z *Escherichia coli* [29], jak i na rybosomach chloroplastów szpinaku [9].

W trakcie infekcji wzrasta produkcja rybosomów. Lafléthe i Bové [43] stwierdzili wzrost inkorporacji H^3 tymidyny do jąderka komórek podlegających infekcji wirusem żółtej mozaiki rzepy (turnip yellow mosaic virus TYMV) i TMV. Wzrost ilości rybosomowego RNA przypada na okres przed powstaniem potomnych cząstek wirusa [24].

Wczesnymi zmianami zachodzącymi w komórkach roślin zainfekowanych przez większość wirusów roślinnych jest pojawienie się w cytoplazmie regionów bogatych w polisomy oraz w cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego.

REPLIKACJA WIRUSOWEGO RNA

Polimeraza RNA specyficzna dla replikacji wirusowego genomu jest enzymem związanym z błonami. Wiele grup wirusów roślinnych powoduje powstawanie w komórce pęcherzyków w wyniku inwaginacji błon różnych struktur komórkowych. Pęcherzyki te zawierają wewnątrz fibryllarny materiał. W niektórych wypadkach stwierdzono, że jest to jedno- i dwuniciowy RNA. Szczepy wirusa żółtej mozaiki rzepy (turnip yellow mosaic virus TYMV) powodują tworzenie się pęcherzyków będących wpukleniem zewnętrznych błon chloroplastu. Pęcherzyki te nie tracą kontaktu z błoną, z której powstały i otwierają się szyjką do cytoplazmy. Hattai i Matthews [36] proponują kolejne zmiany w komórkach chińskiej kapusty wywołane namnażaniem się TYMV. Najwcześniej tworzą się pęcherzyki w peryferycznych częściach chloroplastów. W cytoplazmie przylegającej do chloroplastów pojawiają się małe ilości błon o nieznanym pochodzeniu, prawdopodobnie retikulum endoplazmatycznego. W chloroplastach zwiększa się liczba pęcherzyków. Jednocześnie w cytoplazmie przylegającej do zmieniających się chloroplastów pojawiają się cysterny retikulum endoplazmatycznego, gładkie do strony chloroplastu i z rybosomami po stronie przeciwnej. W następnej fazie cysterny te zanikają, a pojawiają się przestrzenie cytoplazmy przepuszczalne dla elektronów. W przestrzeniach tych znajduje się białko otoczki wirusa. W dalszych etapach następuje skupianie się chloroplastów w większe agregaty, a w cytoplazmie pojawiają się cząstki wirusa. Autorzy sugerują, że do cytoplazmy wydostają się z pęcherzyków replikacyjnych potomne nici (+) wirusowego RNA. W trakcie przesuwania się RNA przez szyjkę pęcherzyka zostaje ono opłaszczane przez białka kapsydu zgromadzone w cytoplazmie. W ustawianiu podjednostek białkowych przy montażu cząstek uczestniczy błona tworząca szyjkę pęcherzyka.

Poniższa tabela obrazuje udział błon różnych struktur komórkowych w powstawaniu pęcherzyków.

Grupa wirusów	Występowanie wirusów i ich pochodzenie	
cząstki o symetrii helikalnej		
<i>genom wirusa zawarty w jednej cząsteczce RNA</i>		
Tobamowirusy długość cząsteczki 300nm to bacco mosaic virus MTV	Brak doniesień o pęcherzykach zawierających RNA	—
Potexwirusy długość cząsteczki 480—580nm potato virus X	Brak doniesień o pęcherzykach zawierających RNA	—
Carlawirusy długość cząsteczki 620—690nm potato virus M PVM potato virus Y PVS	Brak doniesień o pęcherzykach zawierających RNA	—
Potywirusy długość cząsteczki 680—900nm potato virus Y PVY	W cytoplazmie pojedyncze pęcherzyki niewiadomego pochodzenia	
Closterowirusy długość cząsteczki 1200—2000nm beet yellows virus BYV	Pęcherzyki w grupach otoczone zewnętrzną błoną. Pochodzenie ich nie jest jasne [17, 18]	+
<i>genom dwudzielny</i>		
Tobrawirusy długość cząsteczki 185 i 48nm (można znaleźć również cząsteczki o dł. 100nm) tobacco rattle virus TRV pepper ringspot virus PRV	Pęcherzyki pochodzące z błon mitochondriów [34]	+
<i>genom trójdzielny</i>		
Hordeiwirusy długość cząsteczki 110nm, 126nm i 148nm barley stripe mosaic virus BSMV	Pęcherzyki pochodzące z inwaginacji błon otaczających chloroplast [13, 53]	+
cząstki o symetrii icosahedrycznej		
<i>genom wirusa zawarty w jednej cząsteczce RNA</i>		
Tombuswirusy średnica cząstki 30nm tomato bushy stunt virus TBSV	Duże owalne, wielopęcherzykowe struktury pochodzące z peroksyzomów [58] i mitochondriów [59]	+
tobacco necrosis virus średnica cząstki 25—30nm	Brak doniesień o pęcherzykach zawierających RNA	—
Sobemowirusy średnica cząstki 30nm southern bean mosaic virus	Pęcherzyki pochodzące z retikulum endoplazmatycznego [69]	+
velvet tobacco mottle virus virusoid	Dwuniciowe RNA wirusa obserwowane w cytoplazmie, nie otoczone błonami [21]	
Tymowirusy średnica cząstki 30nm turnip yellow mosaic virus TYMV	Pęcherzyki pochodzące z zewnętrznej błony chloroplastu [45]	+

Luteowirusy średnica cząstki 25nm barley yellow dwarf v. BYDV beet western yellows v. BWYV potato leafroll virus PLRV	BYDV ma dwie podgrupy: 1. jednoblonowe pęcherzyki w cytoplazmie i cząstki wirusa najwcześniej obserwowane w cytoplazmie, 2. pęcherzyki dodatkowo otoczone błoną retikulum endoplazmatycznego [28] BWYV — pęcherzyki pochodzące z retikulum endoplazmatycznego [19]. PLRV — pęcherzyki otoczone pojedynczą błoną w cytoplazmie oraz otoczone błonami retikulum endoplazmatycznego i w przestrzeni perynuklearnej [62]	+
maize chlorotic dwarf virus średnica cząstki 30nm	Brak doniesień o pęcherzykach zawierających RNA	—
<i>genom dwudzielny</i>		
pea enation mosaic virus średnica cząstek 29 i 34nm	Pęcherzyki pochodzące z wewnętrznej błony jądrowej przemieszczają się do cytoplazmy dodatkowo otoczone zewnętrzną błoną jądrową [7]	+
Comowirusy średnica cząstek 25nm broadbean true mosaic virus BBTMV cowpea mosaic virus CMV	Jednoblonowe pęcherzyki których, pochodzenie jest niepewne: diktiosomy, retikulum endoplazmatyczne lub zewnętrzna błona jądrowa [51]	+
Nepowirusy średnica cząstek 28nm	Pochodzenie pęcherzyków jak comowirusów	+
<i>genom trójdzielny</i>		
Cucumowirusy średnia cząstek 30nm cucumber mosaic virus CMV tomato aspermy virus TAV peanut strunt virus PSV	Pęcherzyki powstają przez wpuklenie się tonoplastu do wakuoli [35] CMV i TAV [41] PSV. Ponieważ obecne są również pęcherzyki jednoblonowe w cytoplazmie, możliwe jest, że powstają przez oderwanie się z retikulum endoplazmatycznego i migrują do tonoplastu, z którym się łączą. W dwóch wypadkach powstają z diktiosomów: TAV w <i>Chrysanthemum murifolium</i> [46] i CCMV w <i>Nicotiana glutinosa</i> [26]	+
Bromowirusy średnica cząstek 26nm brom mosaic virus BMV cowpea chlorotic mottle V CCMV	Pęcherzyki pochodzące z błon retikulum endoplazmatycznego i błony jądrowej, występujące z przestrzeni wewnątrz retikulum [8, 40]	+
Harwirusy średnica cząstek 27nm, 30nm, 35nm tobacco streak virus TSV	Jednoblonowe pęcherzyki pochodzące z diktiosomów lub retikulum endoplazmatycznego [10]	+
alfalfa mosaic virus cząstki pałeczkowate	Jednoblonowe pęcherzyki w cytoplazmie i na tonoplastcie [15, 57]	+

Przegląd ten wskazuje, że właściwie wszystkie rodzaje błon występujące w protoplaście komórki mogą uczestniczyć w procesach replikacji wirusa. W dużej mierze jest to zależne od wirusa, gdyż obserwuje się, że ten sam wirus w różnych gatunkach roślin gospodarzy powoduje powstanie podobnych zmian cytologicznych. Jednak istnieją i takie przykłady, gdzie określony wirus w różnych gospodarzach powoduje proliferację różnych rodzajów błon komórki.

Pęcherzyki zachowujące ciągłość z błoną, z której powstały, mogą funkcjonować tak jak opisano dla TYMV. Otwierają się one kanalikiem do cytoplazmy, niezależnie od tego z jakich struktur pochodzą. Jest to logiczne ze względu na fakt translacji wirusowego RNA przez rybosomy cytoplazmatyczne. Jednak pęcherzyki wytwarzane przez luteowirusy podlegają licznym metamorfozom i ich mechanizm działania nie jest już tak oczywisty. Natomiast jednobłonowe pęcherzyki np. comowirusów, powstające przez oderwanie się fragmentu retikulum endoplazmatycznego lub od diktiosomu, stanowią zamkniętą przestrzeń ograniczoną ciągłą błoną. Wydaje się, że uwolnienie się z pęcherzyka produktów replikacji powinno się odbywać przez rozerwanie błony otaczającej pęcherzyk i co za tym idzie zniszczenie go. Dla pięciu grup wirusów roślin pęcherzyków w komórkach zainfekowanych nie znaleziono. Są to przede wszystkim wirusy o symetrii helikalnej i genomie zawartym w jednej nici. Przyczyny tego mogą być dwojakie. Najprostszym wytłumaczeniem tego byłaby niedostatecznie wnikliwa obserwacja lub niewłaściwy czas tej obserwacji. Z drugiej strony dla TMV nie opisano struktur pęcherzykowatych, a wirus ten był badany bardzo wnikliwie i przez wielu badaczy. Wiemy, że polimeraza indukowana przez TMV jest związana z błonami, na których występują rybosomy. Powodowane przez TMV zmiany w komórkach (poza agregatami cząstek wirusa) ograniczają się do powstania regionów cytoplazmy zawierających kompleks rybosomów, cystern retikulum endoplazmatycznego, małe pęcherzyki lub wakuole, białka wirusa w granularnej lub tubularnej formie oraz niewielkie ilości cząstek wirusa. Wśród struktur tych nie zaobserwowano pęcherzyków z fibryllarnym materiałem. W wypadku velvet tobacco mottle virus (VTMV) zaobserwowano jednoniciowy i dwuniciowy RNA występujący bezpośrednio w cytoplazmie, nie otoczony żadnymi błonami. Tak więc wydaje się, że nie dla wszystkich wirusów roślinnych mających ssRNA występuje model replikacji z pęcherzykami tworzonymi z błon komórek roślin gospodarzy.

PRZEMIESZCZANIE SIĘ WIRUSÓW W ROŚLINIE

Cykl wirusów zwierzęcych i bakteriofagów kończy się lizą komórki, w której się namnażały. Uwolnione do płynu ustrojowego lub podłoża cząstki wirusów są zdolne do infekowania następnych komórek. W cyklu życiowym omawianych wirusów roślinnych nie występuje ten etap. W całym okresie infekcji rośliny wirus nie opuszcza jej symplastu. Korzysta on z połączeń wewnątrzsymplastowych jako dróg transportu i inwazji następnych komórek. Przemieszczając się

z komórki do komórki, korzysta z istniejących pomiędzy komórkami plasmodesm. Taki typ rozprzestrzeniania się nazywamy transportem z komórki do komórki lub krótkodystansowym. Drugi rodzaj transportu to transport długodystansowy z wykorzystaniem tkanek przewodzących.

Najszerzej uznawaną i prawdopodobnie jedyną drogą translokacji wirusa z komórki do komórki są plasmodesmy. Liczba tych struktur w ścianie komórkowej oraz ich umiejscowienie wpływa na kierunek rozprzestrzeniania się infekcji. Ich średnica wynosi 25—100 nm. W najprostszym typie występuje tylko cytoplazma podstawowa. Zwykle budowa plasmodesmy jest bardziej złożona. Według jednego z modeli przez światło plasmodesmy przebiega desmotubula będąca przekształceniem siateczki retikulum endoplazmatycznego [56]. Powoduje to zawężenie światła. W wielu wypadkach średnica cząstki wirusa lub grubość cząstek nitkowatych przekracza szerokość przestrzeni wewnątrz plasmodesmy dostępnej do penetracji przez te cząstki. Wiele danych wskazuje ponadto, że proces przechodzenia substancji przez plasmodesmy nie jest mechaniczny, gdyż obserwacja struktury zwężonych części plasmodesmy wskazuje, że przy końcach występuje skomplikowany mechanizm przepustowy decydujący, jakiej wielkości i jakie cząstki mogą być transportowane przez światło plasmodesmy.

Cytologiczne obserwacje wskazują, że wiele grup wirusów zmienia strukturę plasmodesm. Comowirusy i nepowirusy powodują powstanie tubuli, wewnątrz których ułożone są cząstki wirusa. Kompleksy wirusowych cząstek i tubul znajdują się w sąsiedztwie plasmodesmy, wchodząc do jej środka jednym końcem i konfiguracji tej towarzyszy przerost ściany komórkowej. Następuje więc modyfikacja kształtu plasmodesmy. Również inne wirusy modyfikują kształt i wielkość plasmodesm, szczególnie powiększając przestrzeń znajdującą się w środkowej jej części. Łączy się to zwykle z występowaniem cząstek w ich świetle.

Jednak dla wielu wirusów, mimo licznych prac związanych z cytologicznymi zmianami powodowanymi przez te wirusy, nie zaobserwowano ich cząstek w plasmodesmach. Dobrym przykładem jest tutaj TMV.

Abstrahując od morfologii samych plasmodesm, coraz więcej mamy danych o tym, że transport wirusów jest związany ze specyficznymi białkami kodowanymi przez wirusa. Pierwsze sugestie dotyczące istnienia wirusowych białek transportowych dotyczyły badań nad mutantami wirusa mozaiki tytoniu TMV. Przemieszczanie się cząstek wirusa w roślinie było zależne od tego, w jakich temperaturach następował rozwój roślin. Wirus rozprzestrzeniał się na całą roślinę, gdy rośliny rosły w niskich temperaturach, a nie przemieszczał się, gdy wzrost roślin zachodził w wysokich temperaturach. Zależne to było od kodowanego przez genom wirusa białka, które było wrażliwe na temperaturę [55]. Mutanty mające upośledzony w wyższych temperaturach transport miały zmienioną sekwencję aminokwasów w białku 30Da w stosunku do szczepu dzikiego. Białku temu zaczęto przypisywać funkcje transportowe.

Oczyszczono i zbadano szereg różnych białek, którym przypisuje się funkcje transportowe. Są to: 30 kDa białko produkowane przez wirus mozaiki tytoniu (TMV), 32 kDa białko produkowane przez wirus mozaiki lucerny (ALMV, 48/58 kDa białka produkowane przez comowirusy, 35 kDa białko produkowane przez wirusa nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej (red clover necrotic mosaic virus RCNMV) oraz 46, 42 i 38 kDa białka produkowane przez wirusa mozaiki kalafiora CaMV. (CaMV jest wirusem ds DNA, dane o białku transportowym tego wirusa przytaczane są tu ze względu na analogie z RNA wirusami). Porównawcze badania białek transportowych produkowanych przez ALMV, brome mosaic virus BMV i TMV, wskazują na brak homologii w sekwencji aminokwasów między tymi białkami, mimo ich zbliżonej wielkości [12]. Może to być wynikiem gatunkowej odrębności roślin gospodarzy dla wirusów produkujących te białka. Z drugiej jednak strony może również odzwierciedlać różnice w funkcjonowaniu białek transportowych. Hull i Atabekovi Talian sky [37] podzielili wirusy roślinne na szereg odrębnych grup biorąc pod uwagę właściwości białek transportowych.

Białko 30 kDa produkowane przez TMV lokalizowane jest specyficjnie w świetle plasmodesm [66]. Białka transportowe produkowane przez comowirusy specyficjnie lokalizowane są wokół tworzących się tubul z wirusami. Ponieważ tubule te wchodzi w kontakt z plasmodesmami, zasocjowane z nimi białko również znajduje się w plasmodesmach. 32 kDa białko produkowane przez CaMV lokalizowane jest w ścianie komórkowej dookoła zmodyfikowanych plasmodesm [49]. Białko transportowe 32 kDa produkowane przez ALMV lokalizowane są w blaszce środkowej, nie tworząc specyficznego zgrupowania przy plasmodesmach [30, 63]. Ponadto białko 30 K TMV i białko produkowane przez wirusa mozaiki ogórka (Cucumber Mosaic Virus CMV) lokalizowane jest na terenie jądra.

Mechanizm działania wirusowych białek transportowych w chwili obecnej jest nie w pełni zrozumiały. Atabekovi Dorokhov [1] sugerowali dwa możliwe sposoby działania tych białek. Jeden z nich polegałby na stworzeniu przepustowości plasmodesm dla cząstek wirusa. Rzeczywiście białko 30 kDa produkowane przez TMV w roślinach transgenicznych zmienia przepuszczalność plasmodesm, pozwalając na przenikanie przez nie znacznie większych cząstek desktranów [71]. Drugi mechanizm polegałby na modyfikacji lub zahamowaniu reakcji komórki na wirusową replikację, reakcji zmierzającej do ograniczenia wirusa do jednej komórki. Lokalizacja białek transportowych w jądrze wskazuje na realność tej ewentualności. Niezależnie od mechanizmu działania samych białek transportowych kodowanych przez genom wirusa transport wirusa wymaga ekspresji dwóch genomów: wirusowego i roślinnego. Białka transportowe powinny znaleźć w roślinie pewne kodowane przez nią faktory po to, aby móc wypełnić swoją funkcję transportową.

Poszczególne wirusy mogą sobie wzajemnie pomagać w transporcie, nawet jeśli należą do odrębnych grup transportowych. Pomocniczy wirus wprowadzo-

ny do rośliny zmienia rodzaj infekcji, np. wirus X ziemniaka (potato virus X PVX) pomaga TMV przemieszczać się w roślinach pomidora mających gen odporności m2 na wirusa mozaiki tytoniu.

Wydaje się ponadto, że w symplacie rośliny, mimo połączenia poszczególnych protoplastów plasmodesmami, istnieją pewne regiony wydzielone. Cloris striate mosaic wirus CSMV namnaża się w liściach *Cloris* z wyjątkiem komórek epidermy [22]. Wirus liściozwoju ziemniaka PLRV jest wirusem ograniczonym do łyka. Namnaża się on w mających jądro komórkach łyka i może się przemieszczać w całej roślinie w obrębie łyka. Znaczy to, że jest on w stanie przechodzić przez plasmodesmy łączące komórki łyka. Znany jest również fakt, że PLRV namnaża się w protoplastach pochodzących z komórek mięksiszu asymilacyjnego. Jednak w warunkach całej rośliny wirus ten nie namnaża się poza łykiem. Sądzi się [3, 4], że wspólna inokulacja wirusem Y ziemniaka (potato virus Y PYV) i PLRV powoduje przemieszczanie się PLRV do komórek mezofilu.

Drugim typem przemieszczania się wirusów jest transport na duże odległości. Istnieją dwie możliwe drogi tego transportu: przez elementy łyka i przez elementy drewna. Główną drogą tego typu transportu wydaje się łyko. W rurkach sitowych obserwowano cząstki różnych wirusów. Raczej do rzadkości należą dane o przemieszczaniu się wirusów przez elementy drewna jak to ma miejsce przy wirusach przenoszonych przez chrząszcze. O ile transport w łyku odbywa się w obrębie symplastu rośliny, o tyle transport przez cewki i naczynia to transport apoplastowy. Nie ma jednak żadnych informacji jak wirusy dostają się do apoplastu i jak przemieszczają się z drewna do protoplastów komórek podtrzymujących ich replikację.

Dotychczas nie stwierdzono, co stanowi czynnik przemieszczany zarówno w trakcie transportu krótko- jak i długodystansowego. Najprościej jest założyć, że są to cząstki wirusa. Występowanie cząstek wirusa w plasmodesmach i w świetle rurek sitowych wydaje się potwierdzać to założenie. Jednak doświadczenia z TMV i ALMV wskazują, że infekcja sąsiednich komórek odbywa się zanim w komórce stanowiącej źródło infekcji pojawi się znacząco duża liczba cząstek wirusa. Ponadto mutanty wirusów, które nie mają zdolności tworzenia całkowitych cząstek, mogą przemieszczać się z komórki do komórki. W tej sytuacji przemieszczać się powinien nagi RNA wirusa. Jednak taki RNA jest bardzo podatny na trawienie endonukleazami znajdującymi się w komórce. Mutanty takie nie dają na ogół infekcji systemicznej, gdyż upośledzony jest ich transport na długie odległości. A t a b e k o v i D o r o k h o v [1] sugerowali, że transportowi podlegają wirusowo specyficzne rybonukleoproteidy inne niż cząstki wirusa.

Zagadnienia transportu wirusa w obrębie jednej rośliny są nadal jeszcze słabo poznane. Wiele faktów wskazuje jednak na to, że dwa rodzaje tego transportu — z komórki do komórki i transport na dalsze odległości podlegają innym uwarunkowaniom i stanowią dwa odrębne procesy.

INKLUZJE BIAŁEK WIRUSOWYCH

W trakcie wirusowej replikacji pojawiają się inkluzje różnego rodzaju białek. Ze względu na specyficzne kształty tych inkluzji i miejsce ich odkładania stanowią one charakterystyczną cechę dla infekcji danym wirusem lub grupą wirusów [45]. Jednak obecnie nie wiadomo jaka jest funkcja tych białek.

Do najbardziej znanych należą inkluzje cylindryczne tworzone przez grupę potywirusów. Są to struktury utworzone z płaskich agregatów białkowych tworzących arkusze. Arkusze takie są nieco zgięte i w klasycznym wypadku przylegają krawędziami do siebie, tworząc strukturę na kształt koła statku parowego. Na przekrojach poprzecznych wygląda to jak rodzaj rozety. W innych wypadkach struktury te nie są tak regularne i tworzą różnego rodzaju zwitki lub płaskie struktury. Białka inkluzji cylindrycznych są kodowane przez genom wirusa, nie są jednak białkami kapsydu. Obserwowano kontakt inkluzji cylindrycznych z plazmolemą, do której inkluzje te przylegają jednym końcem. Obserwacja ta była przyczyną łączenia funkcji białek inkluzji z białkiem transportowym [44], co jednak dotychczas nie zostało potwierdzone.

Wirus X ziemniaka (potato virus X PVX) wywołuje powstawanie specyficznych utworów składających się z białkowych płaszczyzn, na których osadzone są lub nie kuliste granule. Białka te nie są spokrewnione z białkami otoczki, a funkcja ich nie jest znana. Inkluzje białkowe pojawiają się w protoplaście komórki później niż cząstki wirusa i to sugeruje, że nie są istotne dla procesu replikacji.

Inne wirusy należące do grupy potexwirusów (argentine plantago virus APV i boussingaulta mosaic virus BMV) powodują powstanie charakterystycznych inkluzji krystalicznych o regularnym wzorze i nieznanym składzie chemicznym [31]. Występują one nie tylko na terenie cytoplazmy, ale również w jądrze komórki. Powstawanie inkluzji białkowych na terenie jądra jest również charakterystyczne dla innych wirusów, np. potywirusów. Wtrąty te złożone są z ciemno barwiących się globularnych lub bezkształtnych złożeń zgrupowanych po kilkanaście razem. Rzadziej występują regularne układy tubul jak to ma miejsce przy inkluzjach jądrowych powodowanych przez wirusa żółtej mozaiki selera (celery yellow mosaic virus CYMV) i wirusa mozaiki selera (celery mosaic virus CMV).

Powyższy przegląd nie wyczerpuje różnorodnych form inkluzji powodanych przez infekcję wirusową, a nie będących zmienionymi organellami komórki i cząstkami wirusa. Niekiedy występowanie inkluzji białkowych towarzyszy określone etapowi namnażania się, np. ciemne pasma występujące pomiędzy skupiskami cystern retikulum endoplazmatycznego powodowanymi przez TMV. W innych wypadkach inkluzje białkowe gromadzą się w wydzielonych przestrzennie regionach protoplastu komórki. Czas pojawiania się ich jest również różny. Przeważnie jednak pojawiają się w późniejszych etapach cyklu życiowego wirusa.

Porażenie wieloma wirusami nie powoduje tworzenia żadnych inkluzji białkowych, np. carlawirusy.

Wiadomo, że inkluzje cylindryczne potywirusów są kodowane przez genom wirusa. Nie można jednak wykluczyć, że inkluzje towarzyszące infekcji wywołanej przez inne grupy wirusów mogą być kodowane przez genom komórki, a odkładanie ich jest efektem zaburzeń w procesach regulacji produkcji białek rośliny pod wpływem infekcji wirusem.

INKLUZJE CZĄSTEK WIRUSA

W wyniku procesów namnażania się wirusa w cytoplazmie powstają białka kapsydu wirusa i do cytoplazmy uwalniane są nici pozytywne wirusowego RNA. Z tych dwóch komponentów powstają gotowe cząstki wirusa. W bezpośrednim sąsiedztwie cytoplazmatycznych struktur związanych z poprzednimi etapami cyklu życiowego występują cząstki wirusa. Liczba cząstek wytworzonych w komórce zależna jest od izolatu wirusa oraz wzajemnych relacji roślina—wirus.

Dalszym etapem jest tworzenie się inkluzji zbudowanych z gotowych cząstek. Inkluzje takie mogą się składać z wielu cząstek i ich powstanie ma tylko jeden cel, jakim jest zgromadzenie cząstek potrzebnych do porażenia innych roślin. Proces eskalacji porażenia jest procesem związanym z przypadkowymi zdarzeniami takimi, jak żerowanie wektorów, uszkodzenia mechaniczne, ocieranie się sąsiednich roślin o siebie itp., doprowadzającymi do przeniesienia cząstek wirusa z uszkodzonych komórek na inne rośliny.

W protoplaście komórki wiele wirusów tworzy regularne układy jednakowo odległych od siebie cząstek, ustawionych równolegle w wypadku wirusów pałczkowatych i nitkowatych lub tworzących regularny układ przestrzenny w wypadku wirusów kulistych. Przyjęto nazywać takie układy inkluzjami krystalicznymi, choć w rzeczywistości nie są to kryształy. Inkluzje krystaliczne mogą mieć pokaźne rozmiary. Obserwowane w mikroskopie świetlnym inkluzje krystaliczne cząstek TMV miały długość 300 μm . W porównaniu z długością cząstki TMV (300 nm) jest to bardzo duża wartość, porównywalna w rzędzie wielkości z rozmiarami jądra komórkowego. Jednak większości inkluzji nie można zaobserwować z zastosowaniem mikroskopu świetlnego, gdyż ich wielkość ma wartość mniejszą od zdolności rozdzielczej tego mikroskopu.

Układ cząstek wirusa w inkluzji krystalicznej jest charakterystyczny dla danego wirusa. Inkluzje tworzone przez cząstki TMV składają się z warstw grubości jednej cząstki. Ułożenie cząstek w każdej następnej warstwie jest skośne w stosunku do poprzedniej i tworzy układ przypominający ości w szkielecie ryby. Dla carlawirusów charakterystyczne są inkluzje powstałe z pęczków cząstek ułożonych równolegle względem siebie. W sąsiedztwie może występować wiele takich inkluzji ustawionych jedna za drugą. Daje to efekt prążkowania, przy dużych inkluzjach jest on widoczny w mikroskopie świetlnym. Wirus mozaiki ogórka (CMV cucumowirus) tworzy układy krystaliczne cząstek stanowiące sześcioboczną strukturę.

Niektóre szczepy TMV nie formują regularnych inkluzji. Gromadzą się wtedy grupy bezładnie rozrzuconych cząstek.

Najczęstszym miejscem gromadzenia się cząstek jest cytoplazma komórki. W niej gromadzone są inkluzje cząstek takich wirusów jak carlawirusy, hordeiirusy, bromowirusy, i inne. Comowirusy i nepowirusy tworzą tubule, wewnątrz których występują kuliste cząstki wirusa, natomiast cząstki hordeiirusów gromadzą się przez przyłączanie się jednym końcem do błony zewnętrznej otoczki chloroplastów. Wirus M ziemniaka (PVM carlawirus) tworzy inkluzje, w których cząstki jednym końcem przylegają do tonoplastu. Niektóre potywirusy tworzą wąskie mostki cytoplazmatyczne na terenie wakuoli, w których pomiędzy tonoplastem występuje jedna warstwa wirionów.

Innym, częstym miejscem akumulacji cząstek jest wakuola. Wspomniany wirus mozaiki ogórka (CMV) powoduje powstawanie krystalicznych układów cząstek wirusa w wakuoli, podczas gdy w cytoplazmie cząstki CMV tworzą bezładny układ [59]. W niektórych wypadkach cząstki wirusa mogą być gromadzone w jądrze komórki, np. parakrystaliczne inkluzje cząstek hordeiirusów, tobamowirusów i luteowirusów. TMV tworzy agretaty cząstek w chloroplastach, a niektóre tombuswirusy w mitochondriach.

Wszystkie zmiany zachodzące w komórkach porażonych przez wirusy stanowią pewien wspólny zespół zjawisk. Wprawdzie w wielu wypadkach zmiany związane z wczesnymi etapami cyklu życiowego wirusa, jak np. wytworzenie regionu bogatego w rybosomy, zanikają w komórkach, w których występują już inkluzje cząstek wirusa. Jednak deformacje organelli komórkowych związane z pojawieniem się pęcherzyków replikacyjnych trwale zmieniają wygląd organelli. W komórkach są równocześnie rezultaty różnych etapów cyklu życiowego wirusów. Taki zmieniony wygląd komórki może być obserwowany w mikroskopie świetlnym i pierwsze doniesienia pochodzą z początków naszego wieku.

Dodatkowo na zmiany w strukturze komórek powstałe bezpośrednio z namnażania się w nich wirusa nakładają się takie, które są reakcją odpornościową rośliny na porażenie. Należą tu również zmiany w strukturze chloroplastów związane z reakcją chlorotyczną lub związane z powstawaniem nekrozy. W sumie wszystkie te zmiany składają się na cytopatologiczny obraz i sklasyfikowanie poszczególnych zmian jest trudnym zadaniem.

LITERATURA

1. A t a b e k o v J. G., D o r o k h o v Y. L. — *Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses*. Adv. Virus Res. 29, 313—364, 1984.
2. A t a b e k o v J. G., T a l i a n s k y M. E. — *Expression of a plant virus coded transport function of different viral genomes*. Adv. Virus Res. 38, 201—248, 1990.
3. B a r k e r H. — *Invasion of non-phloem in Nicotiana clevelandii by potato leafroll virus is enhanced in plants also infected with potato virus Y potyvirus*. J. Gen. Virol. 68, 1223—1227, 1987.
4. B a r k e r H. — *Specificity of the effect of sap-transmissible viruses in increasing the accumulation of luteovirus in coinfecting plants*. Ann. App. Biol. 115, 71-78, 1989.

5. Brants D.H. — *The susceptibility of tobacco and bean leaves to tobacco mosaic virus infection in relation to the condition of ectodesmata*. Virology 23, 588—594, 1964.
6. Bukrinskaya A.A.G. — *Penetration of viral genetic material into host cell*. /Adv. Virus Res. 141—203, 1982.
7. Burges J.Motoyoshi F., Fleming E.N. — *The mechanism of infection of plant protoplasts by viruses*. Planta 112, 323—332, 1973.
8. Burges J., Motoyoshi F., Fleming E.N. — *Structural changes accompanying infection of tobacco protoplasts with two spherical viruses*. Planta 117, 133—144, 1974.
9. Camarino G., Savi A., Ciferri O. — *A chloroplast system capable to transport heterologous mRNAs*. FEBS Lett. 150, 94—98, 1982.
10. Christie R.G., Edwardson J.R. — *Light and electron microscopy of plant virus inclusions*. FLA Agric. Exp. Stn. Monogr. no. 9, 1977.
11. Cooking E.C. — *An electron microscope study of the initial stages of infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus*. Planta 68, 206—214, 1966.
12. Cornelissen B.J.C., Bol J.F. — *Homology between the proteins encoded by tobacco mosaic virus and two tricornaviruses*. Plant Molecular Biology 3, 379—384, 1984.
13. Carroll T.W. — *Relation of barley stripe mosaic virus to plastids*. Virology 42, 1015—1022, 1970.
14. De Zoeten G.A. — *Early events in plant virus infection [w:] Plant Diseases and Vectors: 221—239* wyd. Maramorosch, K., Harris, K., F., New York, Academic Press, 1981.
15. De Zoeten G.A. — *Possibilities for inter- and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses*. J. Cell. Biol. 40, 814—823, 1969.
16. Durham A.C.H. — *The roles of small ions especially calcium in virus disassembly takeover and transformation*. Biomedicine 28, 3307—3313. 1978.
17. Esau K. — *Cytological and histological symptoms of beet yellows*. Virology 10, 73—77, 1960.
18. Esau K., Hoefert L.L. — *Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet*. Virology 48, 724, 1972.
19. Esau K., Hoefert L.L. — *Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with beet western yellows virus*. J. Ultrastruct. Res. 40, 556, 1972.
20. Esau K., Hoefert L.L. — *Cytology of beet yellows virus infection in Tetragonia. I. Parenchyma cells in infected leaves*. Protoplasma 72, 255, 1971.
21. Francki R.I.B. — *Encapsidated viroidlike RNA [w:] de Diener T.O. The viroids*, Plenum Press, 1987.
22. Francki R.I.B., Hattat, Grylls N.E., Grivell C.J. — *The particle morphology and some others properties of chloris striate mosaic virus*. Ann. Appl. Biol. 91, 51—59, 1979.
23. Francki R.I.B., Milne L.S., Hattat. — *Atlas of plant viruses*. Vols. I and II. CRC Press, Boca Raton, Fl., 1985.
24. Fraser R.S.S. — *The synthesis of tobacco mosaic virus RNA and ribosomal RNA in tobacco leaves*. J. Gen. Virol. 18, 267—279, 1973.
25. Gaard G., de Zoeten G.A. — *Plant virus uncoating as a result of virus-cell wall interaction*. Virology 96. 21—31, 1979.
26. Gerola F.M., Bassi M., Belli G. — *Some observations on the shape and location of different viruses in experimentally infected plants and on the fine structure of the host cells II. Nicotiana glutinosa systemically infected with cucumber mosaic virus strain y*. Caryologia 18, 587—597, 1965.
27. Gerola F.M., Bassi M., Favali M.A., Betto E. — *An electron microscope study of the penetration of tobacco mosaic virus into leaves following experimental inoculation*. Virology 68, 380—386, 1969.
28. Gill C.C., Chong J. — *Cytological evidence for the division of barley yellow dwarf virus isolates into two subgroups*. Virology 95, 59, 1979.

29. Glover J.F., Wilson T.M.A. — *Efficient translation of the coat protein cistron tobacco mosaic virus in a cell free system from Escherichia coli*. Eur. J. Biol. 122, 485—492, 1982.
30. Godefroy-Colburn T., Gagey M. J., Berna A., Stussi/Garand C. — *A non-structural protein of alfalfa mosaic virus in the walls of infected tobacco cells*. J. Gen. Virol. 67, 2233—2239, 1986.
31. Gracia O., Koenig R., Lasemann D.E.J. — *Properties and classification of a potyvirus isolated from three species in Argentine*. Phytopathology 73, 1488, 1983.
32. Gunning B.E.S., Steer M.W. — *The plasma membran [w:] Ultrastructure and the biology of plant celle*. Edward Arnold Ltd. London, 23—26, 1975.
33. Hariharasubramanian V., Hadidi A., Singer B., Fraenkel-Conrat H. — *Possible identification of protein in brom mosaic virus infected barley as a component of viral RNA polimerase*. Virology 54, 190—198, 1973.
34. Harrison B.D., Stefanl Z., Roberts I.M., — *Role of mitochondria in the formatin of X-bodies in cells of Nicotiana clevelandi infected by tobacco rattle virus*. J. Gen. Virol. 6, 127, 1970.
35. Hattat T., Francki R.I.B. — *Cytopathic structures associated with tonoplast of plant cells infected with cucumber mosaic and tomato aspermy viruses*. J. Gen. Virol. 53, 343—346, 1981.
36. Hattat T., Matthews R.E.F. — *The sequence of early cytological changes in chinies cabbage leaf cells following systemic infection with turnip yellow mosaic virus*. Virology 59, 383—396, 1974.
37. Hull R. — *The movement of viruses in plants*. Annu. Rev. Phytopath 27, 213—240, 1989.
38. Kassanis B., White R.F., Turner R.H., Woods R.D. — *The mechanism of virus entry during infection of tobacco protoplast with TMV*. Phytopathol. Z. 88, 215—228, 1977.
39. Kihoy, Abet, Ohashi Y. — *Dissassembly of tobacco mosaic virus by membrane lipid isolated from tobacco leaves and poly-L-ornotine*, Microbiology and Immunology 23, 1067—1076, 1979.
40. Kim K.S., — *An ultrastructural study of inclusions and disease development in plant cells infected by cowpea chlorotic mottle virus*. J. Gen. Virol. 35, 532—543, 1979.
41. Kraev V.G., Semernikova L.I., Vutenko S.I., Parembskaya N.V. — *Certaain structural changes induced by peanut stunt virus in cells of host plants*. Mikrobiol. Zh. (Kiev) 37, 261—264, 1975.
42. Kurtz-Fritsch C., Hirth L. — *Uncoating of two spherical plant viruses*. Virology 47, 385—396, 1972.
43. Laflethe O., Bove J.M. — *Sites incorporation de uridine tritiee dans les cellues du parenchme foliare de Brassica chinensis, saines on infectees par le virus de la mosaique jaune du navet*. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. 266, 1839—1849, 1968.
44. Langenberg W.G., — *Virus protein association with cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat*. J. Gen. Virol. 67, 1161—1168, 1986.
45. Lasemann D.E. — *Cytopathology [w:] The plant viruses Vol. 4, The filamentous plant viruses* (red. R., G., Millne) Plenum Press, 179—2335, 1988.
46. Lawson R.H., Hearon S. — *Subcellular localisation of chrysanthemum aspermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue*. Virology 41, 30—37, 1970.
47. LeRoy C., Stussi-Garand C., Hirth L. — *RNA-dependent RNA polimerases in uninfected and in alfalfa mosaic virus — infected tobacco plants*. Virology 82, 48—62, 1977.
48. Lasemann D.E. — *Virus group-specific and virus specific cytological alternations induced by the members of the tymovirus group*. Phytopath. Z. 90, 315, 1977.
49. Linstead P.J., Hills G.J., Plaskitt K.A., Wilson J.G., Harker C.L., Maule A.J., — *The subcellular location of the gene 1 product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread*. J. Gen. Virol. 69, 1809—1818, 1988.
50. Litz R.F., Kimmins W.C., — *Interpretation of ectodesmata in relation to susceptibility to plant viruses*. Can. J. Bot. 49, 88—90, 1971.

51. Martelli G. P., Russo M. — *Use of thin sectioning for visualisation and identification of plant viruses*. Methods in Virology VIII, 143—224, 1984.
52. Matthews R. E. F. — *The groups of plant viruses [w:] Plant Virology*. Academic Press, 715—732, 1981.
53. McMullen C. R., Gardner W. S., Myers G. A., — *Aberrant plastids in barley leaf tissues infected with barley stripe mosaic virus*. Phytopathology 68, 317—325, 1978.
54. Merckens W. S. W., de Zoeten G. A., Gaard G. — *Observations on ectodesmata and the virus infection process*, J. Ultrastruct. Res. 41, 397—405, 1972.
55. Nishiguchi M., Motoyoshi F., Oshima N. — *Behaviour of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts*. J. Gen. Virol. 39, 53—61, 1978.
56. Robards A. W. — *A new interpretation of plasmodesmal ultrastructure*, Planta 82, 200—210, 1968.
57. Rubio-Huertos M. — *Atlas on ultrastructure of plant tissue infected with viruses*. Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Madrid, 1978.
58. Russo M., Di Franco A., Martelli G. P. — *The fine structure of cymbidium ringspot virus infections in host tissues III. Role of peroxisome in the genesis of multivesicular bodies*. J. Ultrastruct. Res. 82, 52, 1983.
59. Russo M., Martelli G. P., — *Ultrastructure of turnip crinkle and saguaro cactus virus — infected tissues*. Virology 118, 109.
60. Shaw J. C., — *In vivo removal of protein from tobacco mosaic virus after inoculation of tobacco leaves*. Virology 31, 665—675, 1967.
61. Shaw J. C., — *In vivo removal of protein from tobacco mosaic virus after inoculation of tobacco leaves II. Some characteristics of the reaction*. Virology 37, 109—116, 1969.
62. Shepardsen S., Esau K., McCrum — *Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus*. Virology 105, 379, 1980.
63. Stussi-Garaud C., Garaud J. C., Berna A., Godefroy-Colbun T. — *In situ location of an alfalfa mosaic virus non-structural protein in plant cell walls: correlation with virus transport*. J. Gen. Virol. 68, 1779—1784, 1987.
64. Takebe I. — *Protoplast in the study of plant virus replication*. Compr. Virol. 11, 237—283, 1977.
65. Thomas P. E., Fulton R. W. — *Correlatin of ectodesmata number with nonspecific resistance to initial virus infection*. Virology 34, 459—469, 1968.
66. Tomenius K., Clapham D., Meshi T. — *Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus*. Virology 160, 363—371, 1987.
67. von Wettstein D., Zech H. — *The structure of the nucleus and cytoplasm in hair cells during tobacco mosaic virus reproduction*. Z. Naturforsch, Feilb 17, 376—379, 1962.
68. Watts J. W., King J. M. — *The effect of change on infection of tobacco protoplasts by bromoviruses*. J. Gen. Virol. 65, 1709—1712, 1984.
69. Weintraub M., Ragetli H. W. J. — *Electron microscopy of the bean and cowpea stains of southern bean mosaic virus within leaf cells*. J. Ultrastr. Res. 32, 167, 1970.
70. Wilson T. M. A., — *Nucleocapsid disassembly and early gene expression by positive-strand RNA viruses*. J. Gen. Virol. 66, 1201—1207, 1985.
71. Wolf S., Deom C. M., Beachy R. N., Lucas W. J. — *Movement protein of tobacco mosaic virus modified plasmodesmal size exclusion limit*. Science 246, 337—339, 1989.
72. Zaitlin M., Duda C. T., Petti M., A. — *Replication of tobacco mosaic virus V. Properties of the bound and solubilized replicase*. Virology 53, 300—311, 1973.
73. Zabel P., Jongen-Neveh J., van Kammen A. — *In vitro replicatin of cowpea mosaic virus RNA. II. Solubilisation of membrane-bond replicase and the partial purification of the solubilized enzyme*. J. Virol. 17, 679—687, 1976.