

WŁADYSŁAW GOLINOWSKI, EWA KUPIDŁOWSKA

CYKL ŻYCIOWY WIRUSÓW ROŚLIN W ŚWIELE BADAŃ CYTOLOGICZNYCH

Wirusy roślinne i wywołwane przez nie choroby są przedmiotem intensywnych badań od wielu lat. W początkowym okresie, o szybkim rozwoju wirusologii roślin zdecydowały przede wszystkim względy ekonomiczne. Wirusowe choroby roślin, rozprzestrzeniając się bardzo szybko, powodowały ogromne straty gospodarcze, związane z obniżeniem plonów roślin uprawnych.

Patolodzy skoncentrowali więc swą uwagę głównie na diagnostyce chorób i opracowaniu metod ich zwalczania. Cytologia była tu i pozostaje do dziś jedynie pomocniczą dziedziną wiedzy, dostarczającą szybkich metod do identyfikacji i charakterystyki inkluzji wewnątrzkomórkowych, wywoływanych procesem patologicznym.

Badania cytoanatomiczne dostarczają też, niezbędnych dla dokładnego zbadania przebiegu procesu chorobowego, informacji o stopniu zniszczenia tkanek porażonych wirusami roślin.

Możliwość otrzymania z materiału roślinnego względnie prostymi metodami i w krótkim czasie dużej ilości wirusa zdecydowała również o tym, że podstawowe badania z zakresu wirusologii ogólnej zapoczątkowano na wirusach roślinnych. Badania te prowadzone *in vitro* w układach bezkomórkowych dostarczyły wielu danych na temat struktury wirusów, sekwencji aminokwasów w białkach kapsydu, interakcji między kwasami nukleinowymi a białkiem. Przyczyniły się też w znacznej mierze do wyjaśnienia pewnych uniwersalnych problemów z zakresu genetyki, mechanizmów regulacji biosyntezy białka itp.

Jednakże badania nad wirusami roślinnymi *in vivo* pozostają dziś daleko w tyle

Skróty używane w tekście: AMV — wirus mozaiki lucerny, BBMV — wirus plamistej mozaiki bobiku, BMV — wirus mozaiki stokłosa, BSMV — wirus pasiastej mozaiki jęczmienia, CCMV — wirus pstrokatej chlorozy wyki, CLRV — ang.: citrus leaf rugose virus, CpMV — wirus mozaiki wyki, EAMV — wirus właściwej mozaiki bobiku, PEMV — wirus ostrej mozaiki grochu, TMV — wirus mozaiki tytoniu, TRV — wirus nekrotycznej kędzierzawki tytoniu, TSV — wirus smugowatości tytoniu, TYMV — wirus żółtej mozaiki rzepy.

za analogicznymi badaniami dotyczacymi wirusow zwierzecych i bakteriofagow. Dzieje sie tak dlatego, ze wirusy replikujace sie w tkankach roslinnych sa wyjatkowo trudnym obiektem badan.

Glovnym problemem jest brak synchronicznej replikacji, wielokrotna infekcja zwiazana z miedzykomorkowym transportem wirusow, a takze trudnosci w podawaniu i pomiarze inkorporacji znakowanych prekursorow.

Wydaje sie, ze wspolczesna cytologia dysponuje obecnie technikami pozwalajacymi na osiagniecie zadowalajacych rezultatow w badaniach nad replikacja wirusow *in vivo*. Wprowadzenie do badan cytologicznych mikroskopii elektronowej znacznie zwiekszylo zasieg i precyzje obserwacji, poprzez ujawnienie nowych szczegolow ultrastruktury komorki, niewidocznych w mikroskopie swietlnym.

Metoda mikroskopii elektronowej, aczkolwiek jest zrodlem wielu informacji na temat patologicznych struktur wystepujacych w porazonych wirusami komorkach, to jednak stosowana wylaczenie, nie moze przyblizyc szczegolow zwiazanych z replikacja wirusow. Konieczne jest zastosowanie techniki znakowanych przeciwcial i autoradiografii.

Pierwsza z nich pozwala na zlokalizowanie w komorce specyficznych antygenow, ktorymi moga byc wiriony lub puste kapsydy. Przeciwciala znakowane sa zwykle enzymami (Avrameas 1970), ferrytyna (Morgan 1972), metalami ciiezkiymi lub izotopem ^{125}I . Najbardziej czula i dokladna wydaje sie byc metoda z zastosowaniem ferrytyny.

Technika autoradiograficzna oparta jest na inkorporacji *in vivo* znakowanych izotopami prekursorow kwasow nukleinowych. Promieniowanie emitowane przez izotopy powoduje zaczernienie emulsji fotograficznej, ktora powleka sie odpowiednio spreparowany skrawek tkanki. Metoda ta pozwala na wykrycie minimalnych nawet ilosci znakowanych zwiazkow, jednakze jej wada w zastosowaniu do badan wirusologicznych, jest niemoznosc odróżnienia przy jej pomocy (+) RNA od (-) RNA.

Coraz wieksze zastosowanie w cytologii roslin, w tym rowniez w dziedzinie badan wirusologicznych, ma technika izolowanych protoplastow. Pozwala ona na przeprowadzenie rownoczesnej infekcji i uzyskanie synchronicznej replikacji wirusa w protoplastach. Umozliwia to z kolei obliczenie czasu trwania poszczegolnych etapow cyklu zyciowego wirusa.

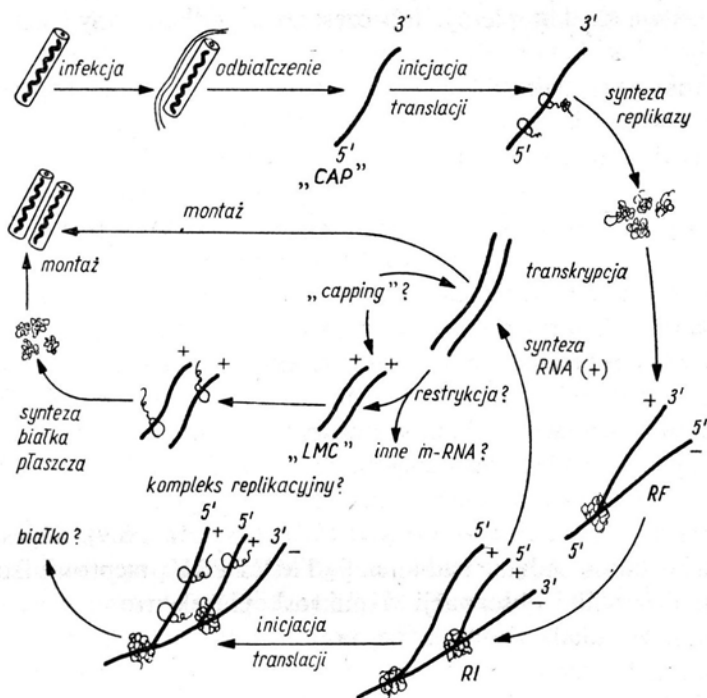
Poprzez analogie do znanego cyklu namnazania zwierzecych wirusow z grupy „picorna”, oraz bakteriofagow zawierajacych RNA (Sugiyama, Korant i Lönberg-Hohn 1972), mozna wykazac kilka etapow, ktore musza istniec takze w procesie replikacji wirusow roslinnych. Kazdy z tych etapow moze odbywac sie w jednym lub wielu odrębnym obszarach komorki. Prawdopodobne jest tez, ze kilka roznych procesow zwiazanych z namnazaniem wirusa zachodzi rownoczesnie w roznych miejscach. Dla wspolczesnej cytologii aktualnym i niezwykle waznym problemem do rozwiązania jest ustalenie sekwencji etapow replikacji wirusa i ich zlokalizowanie w komorkach, gdzie jadro, mitochondria, chloroplasty posiadaja polimerazy RNA, a takze, analogicznie do cytoplazmy system umozliwiajacy biosynteze bialek.

Hipotetyczne modele cyklu zyciowego wirusa byly wielokrotnie proponowane przez wirusologow (La Fleche i in. 1972). W chwili obecnej najlepiej udokumento-

wanym wydaje się być model przedstawiony przez Zaitlina (1976), a dotyczący cyklu życiowego TMV.

Aczkolwiek autor nie uwzględnił w nim kilku istotnych aspektów, np. interakcji wirusa z komórką gospodarza, zaproponowany przez niego schemat namnażania wirusa wart jest dokładnego omówienia. Cykl życiowy TMV składa się z następujących faz:

A. Infekcja: pokonanie barier, jakie stanowią: ściana komórkowa i plazmalemma, oraz usunięcie białka kapsydu z jednoczesnym uwolnieniem genomu wirusa.



Ryc. 1. Schemat ilustrujący model cyklu życiowego wirusa mozaiki tytoniu (wg Zaitlina 1976)

B. Wczesna translacja: na matrycy genomu wirusa odbywa się translacja cistronu replikazy: konsekwencją jest wytworzenie systemu RNA — zależnej polimerazy RNA.

C. Replikacja genomu TMV: przy udziale RNA — zależnej polimerazy RNA odbywa się transkrypcja (+)RNA wirusa w komplementarną sekwencję (-)RNA, a następnie na matrycy łańcucha (-) synteza potomnych genomów.

D. Translacja TMV-RNA: synteza białka poprzez translację krótkich m-RNA, zawierających cistron białka kapsydu.

E. Montaż wirusa: połączenie potomnych genomów z białkowymi podjednostkami kapsydu.

Dowody na istnienie wymienionych etapów w namnażaniu wirusów roślin uzyskano już dla ok. 15-tu wirusów. W dalszej części pracy zostanie przedstawiony ich krótki przegląd.

Infekcja

Proces infekcji trwa od momentu zaadsorbowania wirusa na powierzchni ścian komórkowych lub plazmalemy, jeśli inokulowane są izolowane protoplasty, do rozpoczęcia syntezy polimerazy RNA. Z etapem tym związane są dwa procesy: oddzielenie białka kapsydu od RNA i wniknięcie RNA na teren protoplastu komórki. Faza infekcji, aczkolwiek intensywnie badana, budzi nadal wiele kontrowersji. Wiążą się one z następującymi zagadnieniami:

1. Ustalenia czy „odbiałczanie” poprzedza proces wnikania, tzn. czy do cytoplazmy przedostaje się kompletny, lub częściowo „odbiałczony” wirion czy tylko RNA.

2. Wskazania ewentualnych miejsc i warunków odłączania kapsydu od RNA.

3. Sposobu wnikania wirionu lub RNA do cytoplazmy.

Dotychczas dwa fakty dotyczące infekcji wydają się bezsporne:

1. Na powierzchni komórek roślin nie stwierdzono specyficznych obszarów, o szczególnym powinowactwie do cząstek wirusa, mogących pełnić funkcję akceptorów.

2. Wirusy roślin, w przeciwieństwie do bakteriofagów nie posiadają mechanizmów umożliwiających aktywną penetrację przez ścianę komórkową i plazmalemmę.

Inokulacja musi zatem łączyć się z mechanicznym uszkodzeniem tych 2 struktur, aby zapewnić bezpośredni kontakt wirusa z cytoplazmą komórki gospodarza.

Istnieją dane wskazujące na to, że struktury zawierające lipidy osłabiają oddziaływanie pomiędzy RNA a białkiem kapsydu, ułatwiając ich oddzielenie (Casper 1963). Na tej podstawie wielokrotnie wskazywano na kutikulę jako miejsce „odbiałczania” wirusów (Merkens, de Zoeten, Gaard 1972; Gerola 1969). Sugestie te wydają się potwierdzać ostatnie badania nad infekcją TMV i TRV przeprowadzone z zastosowaniem autoradiografii i obserwacji w mikroskopie elektronowym.

Stwierdzono, że zaadsorbowane na powierzchni ścian komórkowych cząstki wirusa ulegają „odbiałczaniu” a następnie inaktywacji (Kassanis, Kenten 1978; Gaard, de Zoeten 1978). Z danych tych można wnioskować, że proces „odbiałczania” takich wirusów jak TMV, TRV odbywa się na powierzchni ściany komórkowej i na teren cytoplazmy wnika tylko RNA.

Jednakże dla niektórych wirusów o wielodzielonym genomie, m. in. AMV, TSV, CLRV stwierdzono, że obecność białka płaszcza konieczna jest dla zapoczątkowania replikacji wirusów. Inokulacja komórek mieszaniną RNA z trzech największych cząstek wirusa nie daje pozytywnego wyniku w postaci replikacji, natomiast dodanie białkowych podjednostek płaszcza do inokulum aktywuje genom. Stwierdzono, że funkcja płaszcza białkowego nie polega na ochronie RNA przed nukleazami komórki gospodarza, gdyż jego zdolność do zwiększania infekcyjności występuje już nawet w obecności 4—8 podjednostek białkowych na 1 cząsteczkę RNA. Przypuszcza się, że białko płaszcza konieczne jest do zapoczątkowania translacji polimerazy RNA (Bol i in. 1971; Mohier i in. 1974; Van Vloten-Doting 1975; Goncalves, Garnsey 1975a i b; Alblas, Bol 1978). Dane te sugerują, że podczas

infekcji, obok RNA również białko płaszczka wnika na teren cytoplazmy inokulowanych komórek.

Mechanizm wnikania wirusów jest szczególnie intensywnie badany przy zastosowaniu izolowanych protoplastów. Istnieją dane wskazujące, że jest to proces analogiczny do pinocytozy. Świadczy o tym zaobserwowane przy pomocy mikroskopu elektronowego wpuklanie plazmalemmy w miejscach adsorpcji wirusa, prowadzące do wytworzenia na terenie cytoplazmy pęcherzyków zawierających cząstki wirusa (Cocking, Pojnar 1969; Otsuki i in. 1972; Honda i in. 1974, 1975).

Prace Burgessa, Motoyoshi, Fleming (1973) dowodzą innego mechanizmu wnikania wirusów do wnętrza protoplastów. Fakt, że infekcja zachodzi z wysoką wydajnością w temp. 0°C, a także stymulowana jest przez szok osmotyczny, czy mechaniczne uszkodzenia plazmalemmy, świadczy, że wnikanie nie jest procesem fizjologicznym, i wymaga bezpośredniego kontaktu wirusa z cytoplazmą komórki (Motoyoshi, Hull 1974; Kubo i in. 1976).

Synteza polimerazy RNA

Zgodnie z przedstawionym we wstępie schematem cyklu życiowego TMV, po odsłonięciu genomu wirusa, na terenie protoplastu odbywa się synteza RNA-zależnej polimerazy RNA.

Aczkolwiek cała cząsteczka wirusowego RNA służy jako messenger w tym procesie, stwierdzono, że translacji podlega jedynie cistron polimerazy (Zaitlin 1976).

Brak jest obecnie danych wskazujących jednoznacznie, czy w genomie wirusa zawarta jest informacja dla całego białka polimerazy, czy też, analogicznie jak w przypadku bakteriofaga Q β (Kamen 1970; Kondo i in. 1970), komórki gospodarza dostarczają białkowe podjednostki wchodzące w skład enzymu.

Miejszem translacji jest prawdopodobnie cytoplazma; potwierdzają to wyniki Zaitlina i in. (1968), którzy stwierdzili wrażliwość replikacji TMV na cykloheximid, blokujący biosyntezę białka na cytoplazmatycznych rybosomach.

Bradley i Zaitlin (1971), oraz inni badacze opisali istnienie w komórkach porażonych TMV dwóch systemów RNA — zależnej polimerazy RNA: związanej z frakcją błonową i niezwiązanej. Enzym związany z błonami nie wymaga egzogenego RNA jako wzorca, produkt jego działania jest niewrażliwy na RN-azę, a swą ruchliwością elektroforetyczną przypomina dwuniciowe RNA. Enzym niezwiązany z błonami, a także enzym oddysocjowany od frakcji błonowej wymaga dodatku egzogenego RNA jako wzorca do transkrypcji. (Bradley, Zaitlin 1971; Brishamar, Juntti 1974; Zaitlin i wsp. 1973).

Podobne wyniki otrzymał Le Roy i wsp. Wyizolował z komórek tytoniu porażonych AMV dwie polimerazy RNA: związaną z frakcją błonową i niezwiązaną. Obydwa te enzymy różniły się własnościami: polimeraza niezwiązana była niespecyficzna względem RNA wirusa oraz zdolna do syntezy tylko krótkich fragmentów

RNA, komplementarnych do wzorca. Polimeraza z frakcji błonowej syntetyzowała RNA o długości analogicznej do wzorca (Le Roy i in. 1977).

Stwierdzenie istnienia w komórkach zdrowych roślin aktywności RNA zależnej polimerazy RNA (Astier-Manificier, Cornuet 1971, 1973), a także doniesienia mówiące o syntezie dwuniciowego RNA w obecności aktynomycyny D w ekstrakcie komórkowym z roślin zdrowych i porażonych TMV (Zaitlin i in. 1973), wskazują na obecność również w zdrowych komórkach systemu RNA zależnej polimerazy RNA. Dane te sugerują inny od dotychczas przyjętego mechanizm działania wirusa w porażonej komórce. Mógłby on polegać na modyfikacji istniejącego w komórkach systemu RNA zależnej polimerazy RNA przez produkty translacji genomu wirusa i uczynienie tego systemu specyficznym i zależnym od RNA wirusa jako wzorca (Hamilton 1974).

Obecność dwóch rodzajów RNA-zależnej polimerazy RNA stwierdzono też w komórkach *Vigna sinensis* porażonego CCMV (White, Dawson 1978). Polimeraza wyizolowana z supernatantu homogenatu komórkowego, z roślin zdrowych i porażonych nie wykazywała specyficzności dla wzorca i syntetyzowała krótkie odcinki dwuniciowego RNA. RNA o podobnym ciężarze cząsteczkowym syntetyzowane były przez polimerazę wyizolowaną z frakcji błonowej homogenatu ze zdrowych roślin.

Jedynie polimeraza związana z błonami, pochodząca z komórek porażonych CCMV wykazywała specyficzność względem CCMV-RNA. Postulowana jest możliwość funkcjonowania polimerazy niezwiązanej jako składnika polimerazy wirusowej.

Replikacja

Trzeci etap cyklu życiowego TMV, faza replikacji prowadzi do syntezy dwóch charakterystycznych rodzajów RNA:

formy replikatywnej, złożonej z genomu wirusa i komplementarnego do niego łańcucha (-) RNA,

formy pośredniej, złożonej z (-) RNA i syntetyzowanych komplementarnych do niego potomnych (+) RNA (Jackson i in. 1971; Nilson-Tillgren i in. 1970).

Obydwie te formy zostały wielokrotnie wyizolowane z homogenatów komórek porażonych TMV i wirusami o podobnej strukturze, a także wirusami o wielodzielnym genomie np. AMV, BMV (Hamilton 1974).

Dla badaczy zajmujących się replikacją wirusów w aspekcie cytologicznym, dwuniciowe RNA, stosunkowo łatwe do identyfikacji, odgrywa rolę swoistego markera umożliwiającego zlokalizowanie replikacji RNA wirusa na terenie komórki.

Wcześniejsze prace, prowadzone na homogenatach komórkowych (Ralph i in. 1971), pozwoliły na wykazanie związku dwuniciowego RNA z błonami plazmatycznymi. Jednakże badania te nie dostarczyły odpowiedzi na pytanie, z jakich struktur komórkowych pochodziły obserwowane w badanej frakcji błony.

Na terenie porażonych wirusami komórek, wielokrotnie obserwowano tworzenie

się cytopatologicznych struktur. Po strawieniu RN-azą jednoniciowych odcinków RNA, w obszarach tych stwierdzono autoradiograficznie obecność dwuniciowego RNA i aktywnej polimerazy RNA.

CpMV powoduje tworzenie się na terenie cytoplazmy pęcherzyków. Na podstawie analizy inkorporacji ^3H -urydyny, wykazano w nich aktywność polimerazy RNA i obecność dwuniciowego RNA (De Zoeten i in. 1974).

Występowanie na terenie cytoplazmy złogów amorficznej, białkopodobnej substancji i rozproszonych w niej pęcherzyków zawierających dwuniciowe RNA, stwierdzono w komórkach bobu, porażonych EAMV (Hatta, Francki 1978).

W przypadku TYMV, z pęcherzykami powstającymi w peryferycznej strefie chloroplastów związane jest dwuniciowe RNA i polimeraza RNA (La Fleche i in. 1972).

PEMV również powoduje powstawanie pęcherzyków, które najwyraźniej powstają z błony jądrowej. Metodami serologicznymi i autoradiograficznymi stwierdzono na terenie kariolimfy obecność dwuniciowego RNA, a także niewrażliwą na aktynomycynę D, RNA zależną syntezę RNA. Dane te sugerują, że kariolimfa jest miejscem replikacji PEMV-RNA (De Zoeten i in. 1976).

Obserwacje cytologiczne przebiegu procesu chorobowego w przypadku infekcji wirusem liściozwoju ziemniaka, wykazały zmiany strukturalne w jądrach komórek miękiszowych. Obserwowano również proliferację błon na terenie cytoplazmy komórek miękiszowych floemu ziemniaka. Zastosowanie autoradiografii na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego pozwoliło wykazać, że replikacja genomu wirusa odbywa się na terenie jądra komórkowego (Golinowski, De Zoeten 1976; Golinowski 1976).

Charakterystyczną cechą replikacji małych bakteriofagów zawierających RNA jest fakt, że transkrypcja ich RNA sprzężona jest z translacją potomnych genomów i oba te procesy zachodzą w jednostce zwanej kompleksem replikacyjnym (Hottham-Iglewski i in. 1968). Kompleks taki składa się z formy pośredniej, gdzie tworzące się (+) RNA połączone są z rybosomami. Translacja na matrycy (+) RNA rozpoczyna się przed zakończeniem transkrypcji.

W odniesieniu do wirusów roślin, dyskutowane jest obecnie istnienie w ich cyklu życiowym kompleksu replikacyjnego. Dane, które mogłyby potwierdzić tę hipotezę, ograniczone są jedynie do stwierdzenia, że niewielka część formy pośredniej w tkankach porażonych TMV związana jest z polirybosomami i nie mogą stanowić przekonującego dowodu (Beachy, Zaitlin 1975).

Translacja

Do niedawna panował pogląd, że synteza białka płaszczą odbywa się w oparciu o nowo zsyntetyzowane nici (+) RNA wirusa (Babos 1971; Weissmann i in. 1973). Pogląd ten jednakże nie znalazł potwierdzenia w świetle ostatnich badań nad translacją genomu wirusa. W badaniach nad translacją TMV-RNA *in vitro* stwierdzono, że syntetyzowane białko ma niski ciężar cząsteczkowy. Oznacza to, że podczas translacji większa część m-RNA nie jest odczytywana (Zaitlin i in. 1976).

Z komórek porażonych TMV wyizolowano krótkie fragmenty TMV-RNA, o niewielkim ciężarze cząsteczkowym, które nazwano L. M. C. (ang. low molecular weight components (Jackson i in. 1972; Siegel i in. 1973).

Stwierdzono, że L. M. C. nie hybrydują z TMV-RNA (+), natomiast pozytywny wynik daje hybrydyzacja z (-) RNA (Siegel i in. 1973). Dane te wskazują, że L. M. C. zawierają sekwencję nukleotydów jednakową z fragmentem genomu wirusa.

Dalsze badania wykazały, że L. M. C. są wysoce aktywnymi messengerami, a produktem ich translacji jest białko płaszcz. Stąd wniosek, że L. M. C. zawierają gen białka płaszcz i powtórzona jest w nich sekwencja nukleotydów położona przy 3' końcu TMV-RNA (Hunter i in. 1976; Siegel i in. 1976).

Podobne RNA o niskim ciężarze cząsteczkowym, zawierające gen białka strukturalnego wyizolowano z komórek porażonych BBMV (Romero 1973) i TYMV (Klein i in. 1976).

Synteza białkowych podjednostek płaszcz odbywała się poprzez translację tych krótkich RNA.

Zagadnieniem nie wyjaśnionym pozostaje pochodzenie L. M. C. Nie wiadomo, czy są one syntetyzowane w takiej postaci podczas replikacji RNA, czy powstają w wyniku posttranskrypcyjnej restrykcji potomnych genomów. Za tą pierwszą możliwością przemawia fakt, że forma pośrednia często związana jest z obecnością krótkich m-RNA, na których stwierdzono obecność polirybosomów (Beachy, Zaitlin 1975).

W przypadku infekcji komórek wirusami roślinnymi należącymi do grupy „rhabdoviruses”, istnieją dowody zarówno cytologiczne jak i biochemiczne wskazujące na syntezę białka strukturalnego wirusów i ich RNA na terenie jądra komórkowego (Chambers i in. 1965; Francki, Randles 1972).

W komórkach zainfekowanych TMV, stosując technikę znakowanych ferrytyną przeciwciał, stwierdzono kumulowanie się ferrytyny w cytoplazmie w 2—4 dni po infekcji. Przeciwciała związane były z kompletnymi cząstkami TMV (Shalla, Amici 1967). Jednocześnie wykazano, że chloroplasty nie są miejscem syntezy białka płaszcz TMV.

Replikacja, synteza białek strukturalnych i montaż TYMV, związane są ściśle z chloroplastami. W izolowanych protoplastach zainfekowanych tym wirusem i hodowanych w warunkach niesprzyjających fotosyntezie nie stwierdzono namnażania się wirusa. Dane te wskazują, że energia niezbędna w procesie replikacji TYMV dostarczana jest przez reakcję fosforylacji fotosyntetycznej (Renaudin i wsp. 1976).

Montaż wirionów

Proces łączenia się białkowych podjednostek płaszcz z potomnymi RNA wirusa najdokładniej został poznany dla TMV i TRV. Większość badań dotyczących warunków montażu i degradacji cząsteczek tych wirusów przeprowadzono *in vitro*.

Stwierdzono, że montaż nukleoproteidu wirusa jest procesem biofizycznym,

zależnym od koncentracji RNA i podjednostek białka strukturalnego, od pH, siły jonowej, temperatury, obecności jonów metali i niekiedy związków redukujących (Bancroft 1970). Sugestię Bancrofta wydaje się potwierdzać fakt, że montaż nie jest procesem wysoce specyficznym, i wielokrotnie stwierdzano zjawisko mieszane montażu wirusów strukturalnie podobnych. Matthews (1966) opisał tworzenie się cząstek wirusa złożonych z RNA-TYMV i białka TMV. W komórkach jęczmienia przy jednoczesnej infekcji BSMV i BMV, stwierdzono łączenie się RNA BSMV z białkiem BMV (Peterson, Brakke 1973).

Niewiele jest danych wskazujących na to, który obszar w komórce jest miejscem montażu wirionów.

De Zoeten (1966) stwierdził, że montaż TMV odbywa się na terenie cytoplazmy. Inne wyniki otrzymał Siegel (1971), badając tworzenie się pseudowirionów w komórkach zainfekowanych TMV. Pseudowiriony składały się z białka TMV i z RNA komplementarnego do DNA chloroplastów. Dane te sugerują, że montaż pseudowirionów, a prawdopodobnie i cząstek wirusa może odbywać się w chloroplastach.

Sugestię tę potwierdzają wyniki Singera (1972), który stosując ^{14}C -leucynę, stwierdził akumulację izotopu związanego z TMV w chloroplastowej frakcji homogenatu komórkowego.

Hatta i Matthews (1976) zaproponowali model syntezy składników strukturalnych i montażu TYMV. Podkreślili ścisły związek chloroplastów z procesem montażu wirusa sugerując, że łączenie się białkowych podjednostek płaszcza, zgromadzonych w cytoplazmie i RNA dostarczanego z chloroplastów odbywa się na terenie zewnętrznej błony chloroplastu.

Z przytoczonych w tym krótkim przeglądzie danych na temat udziału badań cytologicznych we współczesnej wirusologii roślin wynika, że cytologia i cytochemia pełnią równorzędną rolę z badaniami biochemicznymi, przede wszystkim w poznaniu interakcji pomiędzy komórką gospodarza a patogenem.

Problemem nadal aktualnym pozostaje zagadnienie: jak dalece infekcja wirusa może zmieniać metabolizm komórek gospodarza i w jaki sposób środowisko tych komórek wpływa modyfikująco na strukturę i genom wirusa.

Istnieją dane wskazujące, że oddziaływania patogen-żywiiciel są wzajemne. Świadczą o tym choćby cytowane wcześniej prace, w których postuluje się udział białek pochodzenia wirusowego w modyfikacji istniejącego w komórkach gospodarza systemu enzymatycznego i podporządkowanie go informacji zakodowanej w genie wirusa.

Wpływ komórek gospodarza na fizykochemiczne własności cząstek wirusa zauważony został już dość dawno. Wielu informacji na ten temat dostarczyły zwłaszcza badania nad replikacją różnych szczepów TMV w roślinach dla tych szczepów specyficznych i nie specyficznych, (Bawden 1958).

Początkowo różnice w intensywności i namnażania się wirusa interpretowano jako wynik różnej wrażliwości na karboksypeptydazy gospodarzy (Rees, Short 1972).

W świetle ostatnich badań zagadnienie to okazało się bardziej złożone. Na

podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym, wielokrotnie wykazano, że szczep „cowpea” TMV, którego gospodarzem są rośliny z rodziny *Papilionaceae*, zawiera obok cząstek o typowej długości, analogicznej do „dzikiego” szczepu TMV także liczną populację cząstek krótkich (Morris 1974). Obserwacje te zostały potwierdzone przez wyizolowanie z roślin porażonych szczepem „cowpea” TMV 2 rodzajów cząstek o długości 300 i 30—40 nm. Oczyszczone RNA z tych cząstek miało ciężar cząsteczkowy odpowiednio 2×10^6 i $0,3 \times 10^6$ (Whitefield, Higgins 1976).

Stwierdzono, że krótsze cząstki RNA zawierają gen białka strukturalnego (Higgins i in. 1976), a więc odpowiadają L. M. C. występującym w czasie replikacji „dzikiego” szczepu TMV. Różnica pomiędzy obydwojma szczepami polega na tym, że L. M. C. „dzikiego” szczepu TMV syntetyzowane są „de novo” podczas każdego cyklu namnażania, podczas gdy L. M. C. szczepu „cowpea” TMV, wnika-jące podczas infekcji jako odrębne wiriony, są w komórkach gospodarza jedynie replikowane. Pod tym względem szczep „cowpea” TMV przypomina wirusy o wielodzielnym genomie, u których krótkie RNA, zawierające gen białka strukturalnego, otoczone jest wspólnym płaszczem białkowym z dłuższą cząsteczką RNA, lub egzystuje jako odrębny wirion.

Ze zmianą gospodarza, w przypadku TMV łączą się więc daleko idące zmiany w strukturze wirusa. Jak dalece i w jaki sposób zmiany te determinowane są przez środowisko komórek gospodarza pozostaje zagadnieniem niewyjaśnionym. Zagadnieniem, które skupia na sobie uwagę wirusologów od bardzo dawna są mechanizmy decydujące o odporności roślin na choroby wirusowe.

Oczywistym jest, że w badaniach nad odpornością pierwszoplanową rolę odgrywają badania cytologiczne i cytofizjologiczne. Stosowana powszechnie w tego rodzaju badaniach technika izolowanych protoplastów okazuje się zawodna. Porównawcze badania replikacji wirusa w komórkach inokulowanych liści i w izolowanych protoplastach sugerują istnienie mechanizmów odpornościowych funkcjonujących na poziomie tkanek.

Motoyoshi i Oshima (1977) w trakcie badań nad genetycznym uwarunkowaniem odporności pomidora na TMV stwierdzili, że protoplasty otrzymane z odpornych roślin łatwo ulegają infekcji TMV, a replikacja wirusa zachodzi w nich z wysoką wydajnością. Podobne wyniki otrzymano w przypadku roślin posiadających gen N, warunkujący powstawanie lokalnych nekroz w miejscu inokulacji wirusem. Inokulacja TMV protoplastów, pochodzących z komórek tych roślin, nie powoduje ich nekrotyzacji (Otsuki i in. 1972). Dla ostatecznego wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za odporność roślin, konieczne jest więc opracowanie nowej metody, pozwalającej na prowadzenie badań na nieuszkodzonych tkankach.

LITERATURA

- Alblas S., Bol J., 1978. Coat protein is required for infection of cowpea protoplast with AMV. *J. Gen. Virol.*, 41: 653—656.
- Astier-Manificier S., Cornuet P., 1971. RNA-dependent RNA polymerase in Chinese cabbage. *Biochim. Biophys. Acta* 232: 484—493.

- Astier-Manificier S., Cornuet P., 1973. RNA Dependent RNA Polymerase in Healthy and Virus-Infected Plants. Presented at 2nd Int. Congr. Plant Pathol., Minneapolis, Minn.
- Avrameas S., 1970. Immunoenzyme techniques: Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies. *Inter. Rev. Cyt.* 27: 349—385.
- Babos P., 1971. TMV-RNA associated with ribosomes of tobacco leaves infected with TMV. *Virology*, 43: 597—606.
- Bancroft J. B., 1970. The self assembly of spherical plant viruses. *Adv. Virus Research*, 16: 99—134
- Bawden F. C., 1958. Reversible changes in strains of tobacco mosaic virus from leguminous plants. *J. Gen. Microbiol.*, 18: 751.
- Beachy R. N., Zaitlin M., 1975. Replication of tobacco mosaic virus VI. Replicative intermediate and TMV-RNA related RNAs associated with polyribosomes. *Virology*, 63: 84—97.
- Boł J. F., Van Vloten-Doting L., Jaspars E. M., 1971. A functional equivalence of top component aRNA and protein in the initiation of infection by alfalfa mosaic virus. *Virology*, 46: 73—85.
- Bradley D. W., Zaitlin M., 1971. Replication of tobacco mosaic virus II. The *in vitro* synthesis of high molecular weight virus specific RNAs. *Virology*, 45: 192—199.
- Brishammar S., Juntti N., 1974. Partial purification and characterization of soluble TMV replicase. *Virology*, 59: 245—253.
- Burgess J., Motoyoshi F., Fleming E. N., 1973. Effect of poly-L-ornithine on isolated tobacco mesophyll protoplasts: Evidence against stimulated pinocytosis. *Planta*, 111: 199—208.
- Caspar D., 1963. Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Adv. Protein Chem.*, 18: 87—121.
- Chambers T., Crowley N. C., Francki R., 1965. Localization of the lettuce necrotic yellows virus in host leaf tissues. *Virology*, 27: 320—328.
- Cocking E. C., Pojnar E., 1969. An electron microscopic study of the infection of tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 4: 305—312.
- De Zoeten G. A., 1966. California tobacco rattle virus, its intracellular appearance and the cytology of the infected cells. *Phytopathology*, 56: 744—754.
- De Zoeten G. A., Assink A. M., Van Kammen A., 1974. Association of cowpea mosaic virus induced double stranded RNA with a cytopathological structure in infected cells. *Virology*, 59: 341—355.
- De Zoeten G. A., Powell C. A., Gaard G., German T. L., 1976. *In situ* localization of pea enation mosaic virus double stranded ribonucleic acid. *Virology*, 70: 459—469.
- Francki R. I. B., Randles J. W., 1972. RNA dependent RNA polymerase associated with particles of lettuce necrotic yellows virus. *Virology*, 47: 270—275.
- Gaard G., De Zoeten G. A., 1978. Plant virus unccatin₃ as result of virus-cell wall interaction. *Virology*, (in press).
- Gerola F. M., Bassi M., Favali M. A., Betto E., 1969. An electron microscopy study of the penetration of tobacco mosaic virus into leaves following experimental inoculation. *Virology*, 68: 380—386.
- Golinowski W., 1976. Badania floemu ziemniaka (*Solanum tuberosum*) roślin zdrowych i porażonych wirusem liściozwoju (potato leaf roll virus). *Zesz. Nauk. SGGW-AR*, 65: 1—64.
- Golinowski W., De Zoeten G. A., 1976. Ultrastructure of potato leaf roll infected plant tissue. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.*, 3: 216. (abstr.).
- Gonsalves D., Garnsey S. M., 1975a. Functional equivalence of an RNA component and coat protein for infectivity of citrus leaf rugose virus. *Virology*, 64: 23—31.
- Gonsalves D., Garnsey S. M., 1975b. Nucleic acid components of citrus variegation virus and their activation by coat protein. *Virology*, 67: 311—318.
- Hamilton R. I., 1974. Replication of plant viruses. *Ann. Rev. Plant Phytopath.*, 12: 223—245.
- Hatta T., Mathews R., 1976. Sites of coat protein accumulation in TYMV infected cells. *Virology*, 73: 1—16.
- Hatta T., Francki R., 1978. Enzyme cytochemical identification of single stranded and double stranded RNAs in virus infected plant and insect cells. *Virology*, 88: 105—117.
- Higgins T., Goodwin P., Whitfield P., 1976. Occurrence of short particles in beans infected with the cowpea strain of TMV II. Evidence that the short particles contain the cistron for coat protein. *Virology*, 71: 468—497.

- Honda Y., Matsui C., Otsuki Y., Takebe I., 1974. Ultrastructure of tobacco mesophyll protoplast inoculated with cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, 64: 30—34.
- Honda Y., Kajita S., Matsui C., Otsuki Y., Takebe I., 1975. An ultrastructural study of the infection of tobacco mesophyll protoplasts by potato virus X. *Phytopathol. Z.*, 84: 66.
- Hotham-Iglewski B., Phillips L. A., Franklin R. M., 1968. Viral RNA transcription-translation complex in *Escherichia coli* infected with bacteriophage R17. *Nature*, 219: 700—703.
- Hunter T. R., Hunt T., Knowland J., Zimmern D., 1976. Messenger RNA for the coat protein of TMV. *Nature*, 260: 759—764.
- Jackson A. O., Mitchell D. M., Siegel A., 1971. Replication of tobacco mosaic virus I. Isolation and characterization of double stranded forms of ribonucleic acid. *Virology*, 45: 182—191.
- Jackson A. O., Zaitlin M., Siegel A., Francki R., 1972. Replication of tobacco mosaic virus III. Viral RNA metabolism in separated leaf cells. *Virology*, 48: 655—665.
- Kamen R., 1970. Characterization of the subunits of QB replicase. *Nature*, 228: 527—532.
- Kassanis B., Kenten R. H., 1978. Inactivation and uncoating of TMV on the surface and in the intracellular spaces of leaves. *Phytopathol. Z.*, 91: 329—339.
- Klein C., Fritsch C., Briand J. P., Richards K. E., Jonard G., Hirth L., 1976. Physical and functional heterogeneity in TYMV RNA: Evidence for the existence of an independent messenger coding for coat protein. *Nucleic Acid Res.*, 3: 3043—3062.
- Kondo M., Gallerani R., Weissmann C., 1970. Subunit structures of QB replicase. *Nature*, 228: 525—527.
- Kubo S., Robinson D. J., Hutchenson A. M., 1976. Uptake of tobacco rattle virus by tobacco protoplasts and the effect of phosphate on infection. *J. Gen. Virol.*, 30: 287—298.
- La Fleche D., Bove C., Dupont C., Maughes C., Astier T., Garnier M., Bove J. M., 1972. Site of RNA replication in the cells of higher plants: TYMV-RNA synthesis on the chloroplasts outer membrane system. *Proc. 8th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc.*: 43—71.
- Le Roy C., Stussi-Garaud C., Hirth L., 1977. RNA dependent RNA polymerase in uninfected and AMV infected tobacco plants. *Virology*, 82: 48—62.
- Matthews R. E. F., 1966. Reconstitution of turnip yellow mosaic virus RNA with TMV protein subunits. *Virology*, 30: 82—96.
- Merkens W., De Zoeten G. A., Gaard G., 1972. Observations on ectodesmata and the virus infection process. *J. Ultrastr. Res.*, 41: 397—405.
- Mohier E., Pinck L., Hirth L., 1974. Replication of alfalfa mosaic virus RNAs. *Virology*, 58: 9—15.
- Morgan G., 1972. The use of ferritin-conjugated antibodies in electron microscopy. *Inter. Rev. Cytol.*, 32: 291—326.
- Morris T. J., 1974. Two ribonucleoprotein components associated with the cowpea strain of TMV. *Am. Phytopathol. Soc. Proc.*, 1: 83.
- Motoyoshi F., Hull R., 1974. The infection of tobacco protoplasts with pea enation mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 24: 89—99.
- Motoyoshi F., Oshima N., 1977. Expression of genetically controlled resistance to TMV infection in isolated tomato leaf mesophyll protoplasts. *J. Gen. Virol.*, 34: 499—506.
- Nilsson-Tillgren T., 1970. Studies on the biosynthesis of TMV III. Isolation and characterization of the replicative form and the replicative intermediate RNA. *Mol. Gen. Genet.*, 109: 246—256.
- Otsuki Y., Takebe I., Honda Y., Matsui C., 1972. Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Virology*, 49: 188—194.
- Otsuki Y., Shimomura T., Takebe I., 1972. Tobacco mosaic virus multiplication and expression of the N gene in necrotic responding tobacco varieties. *Virology*, 50: 45—50.
- Peterson J. F., Brakke M. K., 1973. Genomic masking in mixed infections with brome mosaic and barley stripe mosaic viruses. *Virology*, 44: 54—66.
- Ralph R. K., Bullivant S., Wójcik S. J., 1971. Cytoplasmic membranes; a possible site of tobacco mosaic virus RNA replication. *Virology*, 43: 713—716.
- Rees M. W., Short M. N., 1972. The tryptic peptides and terminal sequences of the protein from the cowpea strain of tobacco mosaic virus. *Virology*, 50: 772—777.

- Renaudin J., Gandar J., Bove J. M., 1976. Replication of TMV in Chinese cabbage protoplasts. *Ann. Microbiol.*, 127: 61.
- Romero J., 1973. Properties of a slow sedimenting RNA synthesized by broadbean leaf tissue infected with broadbean mottle virus. *Virology*, 55: 224—230.
- Shalla T. A., Amici A., 1967. The distribution of viral antigen in cells infected with tobacco mosaic virus as revealed by electron microscopy. *Virology*, 31: 78—91.
- Siegel A., 1971. Pseudovirions of tobacco mosaic virus. *Virology*, 46: 50—59.
- Siegel A., Zaitlin M., Duda C., 1973. Replication of tobacco mosaic virus IV. Further characterization of viral related RNAs. *Virology*, 53: 75—83.
- Siegel A., Hari U., Montgomery J., Kolacz K., 1976. New species of RNA formed during tobacco mosaic virus infection. *Ann. Microbiol.*, 127A: 35 (abstr.)
- Singer B., 1972. Protein synthesis in virus infected plants II. The synthesis and accumulation of TMV and TMV coat protein in subcellular fractions of TMV infected tobacco. *Virology*, 47: 397—404.
- Sugiyama T., Korant B., Lonberg-Hohn K. K., 1972. RNA virus gene expressions and its control. *Ann. Rev. of Microbiol.*, 26: 468—502.
- Van Vloten-Doting L., 1975. Coat protein is required for infectivity of tobacco streak virus: Biological equivalence of the coat proteins of tobacco streak and alfalfa mosaic viruses. *Virology*, 65: 215—225.
- Weissmann C., Billeter M. A., Goodman H. M., Hondley J., Weber H., 1973. Structure and function of phage RNA. *Ann. Rev. of Biochem.* 42: 303—328.
- White J., Dawson W., 1978. Characterization of RNA dependent RNA polymerases in uninfected and CCMV infected cowpea leaves: Selective removal of host RNA polymerase from membranes containing CCMV RNA replicase. *Virology*, 88: 33—43.
- Whitfeld P. R., Higgins T. J., 1976. Occurrence of short particles in beans infected with the cowpea strain of TMV I. Purification and characterization of short particles. *Virology*, 71: 471—485.
- Zaitlin M., Spencer D., Whitfeld P. R., 1968. Studies on the intracellular site of tobacco mosaic virus assembly. *Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury*: 91—103. Eds. Hirai T., Hidaka Z., Vritani I.
- Zaitlin M., Duda T., Petti M. A., 1973. Replication of tobacco mosaic virus V. Properties of the bound and solubilized replicase. *Virology*, 53: 300—311.
- Zaitlin M., 1977. Replication of plant viruses-an overview. *Beltsville Symposia in Agricultural Research*, (1) *Virology in Agriculture*: 33—46. Ed. Allanheld, Osmum and Co. and Universe Books.
- Zaitlin M., Beachy R. N., Bruening G., Romaine C. P., Scalla R., 1976. Translation of tobacco mosaic RNA. *Animal Virology*: 567—581. Ed. Academic Press.

Doc. dr WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

Instytut Biologii Roślin, Zakład Botaniki, SGGW,
ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa,

Mgr EWA KUPIDŁOWSKA

Instytut Biologii Roślin, Zakład Botaniki SGGW,
ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa