

PLAZMODESMY KOMÓRKI ROŚLINNEJ – WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA BUDOWĘ I FUNKCJE

Plasmodesmata of the plant cell – current opinion about structure and function

Rafał BUTOWT

Summary. Current knowledge about cell junctions (called plasmodesmata) is reviewed. The role of plant and viral factors, which probably regulate plasmodesmata permeability, is discussed. An increase in plasmodesmata permeability accompanies for viral infection of plant cells. The movement proteins responsible for this phenomenon are encoded by viral genes. The role of the plasmodesmata in regulation of differentiation processes at the level of tissue and organ is emphasized.

Key words: plasmodesmata, plant intercellular conjunction, intercellular transport, virus movement proteins

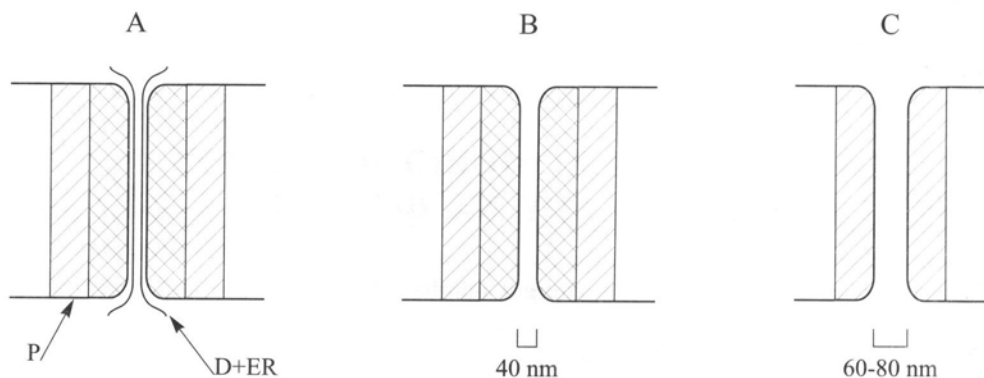
Dr Rafał Butowt, Pracownia Biotechnologii, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, ul. Powstańców Wielkopolskich 10, 85–950 Bydgoszcz

WSTĘP

W ścianach komórkowych roślin znajduje się szereg struktur, przez które z komórki do komórki przechodzą pasma cytoplazmy łączące sąsiednie protoplasty. Struktury te, otoczone błoną będącą przedłużeniem plazmalemy, określa się mianem plazmodesm (ang. plasmodesmata). Obecność plazmodesm po raz pierwszy stwierdził już w 1879 roku Edward Tangl. Postęp badań dotyczących plazmodesm nie był jednak zbyt szybki z powodu trudności w izolowaniu czystych preparatów ścian komórkowych [patrz przegląd: 11, 22, 54, 70]. Do dzisiaj problemy te nie zostały w pełni przezwyciężone, nie udało się bowiem wyizolować dotychczas „czystych plazmodesm” [88]. Z tego względu plazmodesmy są jednymi z najmniej poznanych struktur komórkowych. Niemniej jednak w ciągu ostatnich 10–15 lat nastąpił istotny wzrost wiedzy na temat plazmodesm. Przyczyniło się do tego głównie udoskonalenie metod mikroskopii elektronowej oraz wykorzystanie techniki mikroiniekcji sond fluorescencyjnych o zróż-


nicowanych masach cząsteczkowych. Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych pozwoliło na określenie szybkości przemieszczania się cząsteczek pomiędzy komórkami w warunkach przyżyciowych.


Dotychczasowe badania wskazują, że plazmodesmy są strukturami dynamicznymi, których powstawanie i zanik oraz otwieranie i zamykanie jest regulowane przez szereg czynników fizjologicznych. Dzięki temu organizm roślinny jako całość nie jest konglomeratem pojedynczych, izolowanych komórek, lecz zespołem komórek wzajemnie na siebie oddziaływujących. Regulacja przepuszczalności plazmodesm warunkuje kierunkowy przepływ określonych substancji i przez to wpływa na wzrost i różnicowanie organów i tkanek roślinnych [47, 55, 63, 100]. Na przykład, przez plazmodesmy komórek mezofilowych liści odbywa się transport fotoasymilatów do tkanki przewodzącej. U mutanta kukurydzy – *sed1* – niezdolnego do transportu sacharozy z liści, wykazano występowanie plazmodesm o znacznie zmienionej ultrastrukturze [71, 75]. Fakt uzyskania pierwszego




P = Plazmalemma – *plasma membrane*

D+ER = desmotubula przechodząca w retikulum endoplazmatyczne – *desmotubula undergoing into endoplasmic reticulum*

 = rejon ściany zawierający kalożę – *wall region containing callose*

 = kolar – *collar*

 = ściana komórkowa – *cell wall*

Ryc. 1. Schemat budowy plazmodesmy. A – *in vivo*, B – po traktowaniu detergentem, C – po traktowaniu proteazami lub mocznikiem. W przypadku B i C brak plazmalemmy.

Fig. 1. The outline of plasmodesma structure. A – *in vivo*; B – following the detergent treatment; C – following the proteases or urea treatment; In the case B and C lack of plasma membrane.

mutanta roślinnego charakteryzującego się zaburzoną budową plazmodesm, stanowi zapewne przyczynek do bliższego poznania biochemicznej natury tych struktur.

BUDOWA PLAZMODESM NA POZIOMIE ULTRASTRUKTURALNYM

W organizmach roślinnych wyróżnia się dwie podstawowe drogi transportu metabolitów. Drogę apoplastyczną tworzą ściany przylegających komórek, natomiast drogę symplastyczną tworzą protoplasty połączone plazmodesmami [56].

Plazmodesmy występują w ścianach prawie wszystkich żywych komórek roślinnych. Wyjątek mogą stanowić niektóre komórki linii generatywnej, jak np. ziarna pyłku, w których komórka wegetatywna i komórka generatywna nie są połączone plazmodesmami. Liczba i kształt plazmodesm zależą od gatunku, rodzaju tkanki i

stanu jej zróżnicowania [70]. Mieści się ona najczęściej w granicach od kilkuset do nawet 25 tysięcy na komórkę, jak np. w korze pierwotnej *Viscum album* [70]. Liczba plazmodesm w przeliczeniu na 100 μm^2 powierzchni ściany w różnych komórkach stożka wzrostu korzeni kukurydzy waha się od 500 do około 2000 [42]. Przybliżona sumaryczna powierzchnia plazmodesm nie przekracza zazwyczaj 1% całkowitej powierzchni komórki.

Aktualnie uznawany model budowy plazmodesm został ustalony na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym [67]. Bardziej szczegółowe informacje uzyskano po zastosowaniu mroźniowego utrwalania preparatów ścian w temperaturach rzędu -120°C , lub niższych, oraz zastosowaniu tzw. techniki mrożenia i łamania (ang. freeze-fracture) [18, 78]. Plazmodesmy komórek roślin wyższych tworzą wielocząsteczkowe kompleksy zbudowane z białek, lipidów i polisacharydów. Obserwowana

średnica typowych plazmodesm jest rzędu 40–50 nm (Ryc. 1) [53, 70]. W świetle kanału cytoplazmatycznego, pomiędzy błonami komórkowymi, znajduje się rurkowata struktura zwana desmotubulą [67]. Posiada ona charakter lipidowo-białkowy i wykazuje ciągłość z retikulum endoplazmatycznym [53, 79]. Obecności desmotubuli nie zaobserwowano u glonu ramienicy [22]. Dalsze badania wykażą czy jest to cecha charakterystyczna także dla innych glonów.

Przestrzeń dostępna dla transportowanych cząsteczek znajduje się pomiędzy błoną komórkową a desmotubulą (Ryc.1). Jej średnica wynosi około 1.5–2.5 nm [4, 77]. Wnętrze desmotubuli uniemożliwia transport metabolitów zawartych w świetle retikulum endoplazmatycznego [4]. Jednak wydaje się, że poprzez membranę desmotubuli zachodzi dyfuzja lipidów zawartych w błonach retikulum sąsiadujących komórek [36]. Podobnej międzykomórkowej dyfuzji lipidów nie zaobserwowano wzdłuż plazmalemy [36]. Błone komórkową i desmotubulę można usunąć z powierzchni preparatów ścian komórkowych stosując proteazy i detergenty [79].

Strukturalna specjalizacja w budowie plazmodesmy obserwowana jest również na zewnątrz, tzn. w kierunku ściany komórkowej otaczającej kanał błony komórkowej. Początkowo stwierdzono, że w regionie tym znajduje się struktura zwana kolarzem (ang. collar, dosł. kołnierzyk) [97]. Podstawowym komponentem kolaru wydaje się być kalozę (β -1–3-glukan) [63]. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że region ściany bogaty w kalozę znajduje się poza kolarzem, natomiast sam kolar stanowi odrębną strukturę, o nieznanym dotychczas, prawdopodobnie białkowo-węglowodanowym składzie [88]. Dowodzi tego inkubacja merystemów korzeniowych kukurydzy z kalazą (β -1–3-glukanazą), prowadząca do zniesienia znakowania plazmodesm przeciwciałami antykalozowymi, lecz pozostawiająca nienaruszony kolar [88].

W preparatach przygotowanych metodami mrożeniowymi i analizowanych w powiększeniach rzędu 100 tysięcy razy, błona komórkowa wokół kanału i desmotubula zawiera szereg globularnych, prawdopodobnie białkowych cząstek, które są skierowane do światła kanału [19].

Jak wynika z różnych źródeł, ich liczba na cytoplazmatycznej powierzchni desmotubuli wynosi od 6 do 8, natomiast na cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej wynosi od 9 do 14 [18, 67, 78]. Globularne cząstki znajdują się również wewnątrz desmotubuli, zamykając jej światło. Powszechnie uważa się, między innymi przez analogię do jądrowego kompleksu porowego, że cząstki skierowane do cytoplazmy stanowią białka, których zmiany konformacyjne regulują proces otwierania/zamykania plazmodesm [11, 18, 22]. Zakłada się również, choć brak na to bezpośrednich dowodów, iż pomiędzy globularnymi cząstkami zlokalizowanymi na powierzchni plazmalemy i na powierzchni desmotubuli znajdują się włókienkowate białka mostkowe [7]. Do chwili obecnej, pomimo podjętych prób, nie wyizolowano jednak białek z całą pewnością charakterystycznych jedynie dla plazmodesm [48, 59]. Z drugiej strony, w plazmodesmach komórek liści *Mimosa pudica* Fleurat-Lessard i wsp. [28] wykazali brak H^+ -ATPazy, enzymu występującego w plazmalemie wszystkich zbadanych dotąd komórek roślinnych. Wynik ten wymaga jednak potwierdzenia, gdyż w powyższych badaniach zastosowano tylko jeden typ przeciwciała skierowanego przeciwko centralnej domenie 3 izoformy H^+ -ATPazy obecnej w komórkach *Arabidopsis thaliana*.

Badacze zajmujący się plazmodesmami zwracają uwagę na ich funkcjonalne podobieństwo do połączeń typu „gap-junction” występujących w komórkach zwierzęcych [22, 70]. Cytoplazma przylegająca do obydwu rodzajów połączeń charakteryzuje się podwyższoną zawartością mikrofilamentów aktynowych [91, 95]. Postuluje się udział aktyny (wraz z białkami typu α -aktynina, winkulina) w stabilizacji obszaru plazmalemy otaczającej kanał lub/i regulacji jego przepuszczalności [95]. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko koneksynie, tj. białku regulującemu przepuszczalność połączeń „gap-junction” w komórkach zwierzęcych, wykazało obecność dwóch homologicznych polipeptydów w komórkach korzeni kukurydzy [99]. Polipeptydy te, znane jako PAP26 i PAP27, udało się częściowo oczyścić, lecz ich

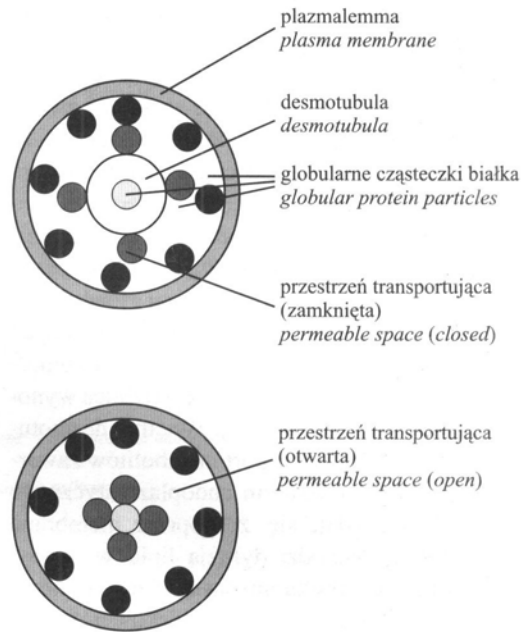
sekwencja aminokwasowa wciąż nie jest znana [22]. Uważa się również, że polipeptydy te nie stanowią roślinnych homologów koneksyny, lecz mogą być fragmentem nieznannej kinazy białkowej [60]. Prawdopodobnie pierwszym specyficznym dla plazmodesm białkiem może okazać się białko o masie 41 kDa, które wykryto metodą immunolokalizacji w mikroskopie elektronowym w plazmodesmach oraz w aparacie Golgiego komórek mezokotyłu kukurydzy [23]. Białko to nie zostało jeszcze bliżej scharakteryzowane, jednak jego obecność zarówno w aparacie Golgiego jak i w plazmodesmach potwierdza hipotezę o powstawaniu tych struktur drogą fuzji pęcherzyków Golgiego.

REGULACJA PRZEPUSZCZALNOŚCI PLAZMODESM

Plazmodesmy nie funkcjonują w stanie całkowitego otwarcia lub zamknięcia, lecz mogą osiągać szereg stanów pośrednich [54]. Parametrem określającym przepuszczalność plazmodesmy w danej chwili jest tzw. graniczna wielkość przepływu (SEL; ang. size exclusion limits). SEL określa maksymalną masę cząsteczkową substancji, która może przenikać przez plazmodesmy w określonych warunkach. Dla większości niepobudzonych komórek roślin wyższych (w warunkach fizjologicznych) wartość SEL ich plazmodesm jest rzędu 700–900 Da [38, 84, 88, 92]. Tymczasem w komórkach glonu *Nitella* stwierdzono swobodne przemieszczanie się przez plazmodesmy cząsteczek o masie do około 40–45 kDa [45], co może być związane z brakiem w plazmodesmach glonów desmotubuli, jak sugerują autorzy tych obserwacji [29].

Wartość SEL rzędu 1 kDa odpowiada przepuszczalnej przestrzeni mikrokanalu cytoplazmatycznego o średnicy 1.5–2.5 nm [18]. W obrębie pojedynczej plazmodesmy znajduje się od 6 do 8 takich „mikrokanalików”. Ich istnienie uwarunkowane jest obecnością globularnych cząstek na powierzchni desmotubuli, schematycznie przedstawionych na rycinie 2.

Przeciętna wartość SEL wskazuje, że w wielu komórkach przez plazmodesmy mogą swo-



Ryc. 2. Hipotetyczny schemat budowy plazmodesmy (przekrój poprzeczny), uwzględniający stan jej otwarcia i zamknięcia (wg [11]).

Fig. 2. Hypothetical scheme of plasmodesma structure covering both the state of opening and closing (after [11]).

dobnie przenikać przynajmniej niskocząsteczkowe metabolity, takie jak cukry czy aminokwasy [7, 33, 56]. Jednak na zdolność przenikania danej cząsteczki wpływa również stopień jej hydrofilności. Badania Tuckera [85] wykazały, że połączenia izotiocyanianu fluoresceiny (FITC) z różnymi aminokwasami przenikają przez plazmodesmy włosków pręcikowych *Setcreasea purpurea* z bardzo zróżnicowaną szybkością, pomimo tego, że ich masy cząsteczkowe nie przekraczały SEL plazmodesm obecnych w badanych komórkach. Najlepiej transportowane były koniugaty FITC z aminokwasami hydrofilowymi o wypadkowym ładunku ujemnym od -2 do -4, natomiast połączenia FITC z tryptofanem i fenyloalaniną praktycznie nie przemieszczały się między komórkami (Tab.1).

Wartość SEL plazmodesmy jest specyficzna gatunkowo i tankowo oraz zależy od zewnętrznych bodźców docierających do ko-

Tabela 1. Plazmodesmalny transport aminokwasów znakowanych FITC wzdłuż komórek włoska precikowego *Setcreasea purpurea*. Sondę wprowadzano poprzez mikroiniekcję do pojedynczej komórki. Rozprzestrzenianie się fluorescencji obserwowano po 5 min. Dla każdej sondy wykonano około 30 prób (wg [85], dzięki uprzejmości autora). B – fluorescencja ograniczona do komórki, do której wprowadzono sondę; S – fluorescencja obejmuje dodatkowo 1–3 komórek; M – fluorescencja obejmuje 4–5 komórek; D – fluorescencja obejmuje liczbę komórek większą od 5.

Table 1. Plasmodesmal transport of amino acids (marked with FITC) along *Setcreasea purpurea* hair cells. Fluorescent probes were put by microinjection into single cell. The spreading of fluorescence was observed after 5 min. 30 experiments were made per every probe (after [85] – owing to the author's kindness). B – the fluorescence was registered only in the cell the probe was put into; S – the fluorescence includes additionally 1–3 cells; M – the fluorescence includes 4–5 cells; D – the fluorescence includes high quantity of cells;

probes	Rozprzestrzenienie się fluorescencji – the spreading of fluorescence			
	%B	%S	%M	%D
F-Gly	0	52	19	29
F-Leu	9	51	40	0
F-Ala	0	0	4	96
F-Ser	0	11	21	68
F-Thr	9	36	23	32
F-Cys	0	53	45	2
F-Met	8	84	8	0
F-Phe	36	64	0	0
F-Try	19	81	0	0
F-Tyr	15	33	30	22
F-Asp	0	10	19	71
F-Glu	0	13	17	70
F-Asn	0	4	5	91
F-Gln	0	44	23	33
F-Lys	0	4	9	87
F-His	6	88	6	0
F-Arg	0	8	13	79
F-(Glu) ₂	0	0	7	93
F-(Glu) ₃	0	33	28	39

mórek [21]. Na przykład SEL, dla komórek korzeni pszenicy wynosi 680 Da [13], natomiast SEL dla analogicznych komórek korzeni *Egeria densa* mieści się w granicach 450–540 Da [25]. Niektóre typy komórek roślinnych posiadają plazmodesmy o wartości SEL znacznie wy-

ższej od 1 kDa. Wartość SEL plazmodesm w komórkach włosków liściowych tytoniu wynosi około 7 kDa [57]. Wartości SEL sięgające 3 kDa odnotowano również pomiędzy komórkami sitowymi i komórkami towarzyszącymi w wiązkach przewodzących [43].

Do szacowania wartości SEL stosuje się standardowo technikę mikroiniekcji sond fluorescencyjnych (do pojedynczej komórki), które są nieprzepuszczalne dla błon biologicznych, a zatem przenikają jedynie przez plazmodesmy [24, 85, 89]. Jako fluorochromy wykorzystuje się zwykle pochodne fluoresceiny lub lucyferyny, które sprzęga się z dekstranami o zróżnicowanej masie cząsteczkowej. Śledząc rozkład koniugatu fluorochrom-dekstran w tkance w funkcji czasu określa się współczynniki dyfuzji i w związku z tym, również wartości SEL [85].

Zastosowanie techniki mikroiniekcji fluorochromów jednocześnie lub bezpośrednio po mikroiniekcji różnych substancji chemicznych (lub po zadziałaniu określonego bodźca fizycznego), umożliwia poznanie wpływu tych substancji na przepuszczalność plazmodesm. Z dotychczasowych badań wynika, że podwyższenie poziomu Ca^{2+} powoduje obniżenie SEL i zmniejszenie przepuszczalności plazmodesm [3, 24, 84]. Podobny efekt do wapnia wywołują także inne kationy dwuwartościowe, jak Mg^{2+} i Sr^{2+} , natomiast mikroiniekcja kationów jednowartościowych (K^+ , Na^+) nie wpływa na szybkość przemieszczania się sondy fluorescencyjnej [24]. Zbliżony do Ca^{2+} efekt wywołują również przekaźniki informacji podwyższające poziom tego pierwiastka w cytoplazmie podstawowej, jak np. 1,4,5-inozytolotrifosforan [3, 82]. Taki sam wpływ na SEL w komórkach włosków precikowych *Setcreasea purpurea* posiada również 1,4-bisfosfoinozytol, nie wpływają natomiast na wartość SEL tych komórek takie związki jak 2-fosfoinozytol oraz myo-inozytol [82]. Przepuszczalność plazmodesm obniża również mastoparan, oligopeptyd, który poprzez aktywację białek G powoduje przyspieszony rozpad fosfoinozytoli i w efekcie wzrost cytozowego stężenia jonów $[Ca^{2+}]$ [87].

Jony Ca^{2+} oraz wtórne przekaźniki informacji mogą wpływać na wartość SEL w sposób po-

średni, poprzez szereg nieznanych dotychczas, wewnątrzkomórkowych procesów. Jedną z hipotez zakłada udział Ca^{2+} w regulacji hipotetycznej kinazy/fosfatazy, która dokonuje fosforylacji/defosforylacji białek obecnych w desmotubuli i plazmalemmie otaczającej plazmodesmę. Proces ten mógłby prowadzić do zmian konformacji plazmodesmalnych białek i w efekcie regulacji SEL całej plazmodesmy [11, 12, 18]. Według innej hipotezy, następuje indukowana przez Ca^{2+} synteza kalozy [26], która tworzy coś w rodzaju zwieracza (ang. sphincter) powodującego szybkie zamknięcie plazmodesmy [64]. Za tym mechanizmem przemawia fakt, że zaobserwowano syntezę plazmodesmalnej kalozy w odpowiedzi na inkubację komórek z jonoforem wapniowym A23187 [37].

Przepuszczalność plazmodesm wzrasta (do wartości SEL od 5 do 10 kDa) po traktowaniu komórek azydkiem sodu [13, 86]. Niektórzy autorzy uważają, że jest to efekt stresu beztlenowego [13]. Trudno jednak interpretować powyższe doświadczenia z uwagi na to, że NaN_3 hamując fosforylację oksydacyjną wpływa pośrednio na wiele innych procesów wewnątrzkomórkowych. Między innymi, powoduje wzrost cytoplazmatycznego poziomu Ca^{2+} [34], obniża pH w cytoplazmie [5] oraz hamuje przepływ cytoplazmy [44]. Charakterystyczne, że w tym przypadku wzrost cytoplazmatycznego poziomu Ca^{2+} nie powoduje zmniejszenia wartości SEL, lecz efekt przeciwny. Wynik ten wskazuje, że jony Ca^{2+} regulują przepuszczalność plazmodesm w sposób pośredni, uzależniony od dostępności innych wewnątrzkomórkowych czynników [86].

Niewiele wiadomo na temat wewnątrzkomórkowych czynników powodujących zwiększenie lub zmniejszenie wartości SEL. Rewelacją w tym zakresie było odkrycie w 1995 roku, że znane już wcześniej u kukurydzy białko KNOTTED1 posiada właściwości zwiększania wartości SEL plazmodesm do co najmniej 20 kDa [55, 100]. Białko to oprócz promowania transportu wysokocząsteczkowych dekstranów, samo aktywnie przemieszcza się przez plazmodesmy oraz umożliwia plazmodesmalny transport własnego mRNA. Jednocześnie wiadomo,

że KNOTTED1 uniemożliwia międzykomórkowy transport RNA o sekwencji antysensownej w stosunku do własnego mRNA [55]. Intrigujący jest fakt, że białko KNOTTED1 jest produktem genu homeotycznego, aktywnego w czasie różnicowania merystemów wierzchołkowych kukurydzy i jako czynnik transkrypcyjny posiada właściwości wiązania się z DNA. Decydująca dla wykrycia związku tego białka z funkcjonowaniem plazmodesm okazała się wcześniejsza obserwacja o obecności mRNA dla białka KNOTTED1 tylko w niektórych regionach merystemu, natomiast samego białka we wszystkich komórkach merystematycznych [55].

PLAZMODESMY JAKO MIEJSCE ROZPRZESTRZENIANIA WIRUSÓW

W badaniach zjawiska transportu przez plazmodesmy fundamentalną kwestią było ustalenie, czy przez struktury te mogą przenikać cząsteczki o masach kilkudziesięciu kDa, takie jak np. białka lub kwasy nukleinowe. Pierwsze dane biochemiczne wskazywały, że zjawisko takie może mieć miejsce *in vivo* między rurkami sitowymi i komórkami towarzyszącymi w tkance przewodzącej [27]. Możliwość transportu endogennych makromolekuł przez plazmodesmy została potwierdzona po wykryciu właściwości opisanej powyżej białka KNOTTED1.

Jednakże pierwszym doskonałym modelem do badania transportu białek i kwasów nukleinowych przez plazmodesmy stały się komórki roślin zainfekowane wirusami. Okazuje się, że wirusowe makromolekuły mogą łatwo przenikać przez plazmodesmy pomimo mas cząsteczkowych rzędu 30–50 kDa [30, 40, 98]. Hipotezę o takim przemieszczaniu się wirusów w organizmie roślinnym wysunął już w 1934 roku G. Samuel [72]. Dalsze badania tego zagadnienia rzuciły pewne światło na zupełnie nieznaną do niedawna mechanizmy międzykomórkowego transportu makromolekuł u roślin, stąd też wymagają osobnego omówienia.

Wirusy wykorzystują dwie drogi rozprzestrzeniania się wewnątrz organizmu roślinnego. Na większe odległości przemieszczają się wykorzystując floem, natomiast między sąsiednimi

komórkami przechodzą przez plazmodesmy [1, 8, 20, 40]. Fakt ten był pierwszym dowodem, że przenikanie makromolekuł przez plazmodesmy jest w ogóle możliwe. Obecnie wiadomo, że pewne białka wirusowe powodują zwiększenie SEL już istniejących plazmodesm lub indukują powstawanie zmodyfikowanych plazmodesm wtórnych [19]. Białka te są niezwykle konserwatywne i zachowują swoje właściwości w stosunku do wielu wirusów roślinnych. Po zainfekowaniu rośliny wirusem BMV posiadającym zmutowane białko odpowiedzialne za transport, wirus ten nie jest zdolny do przemieszczania się przez plazmodesmy. Jeśli jednak tę samą roślinę zainfekuje się dodatkowo dziką formą wirusa mozaiki tytoniu (TMV), wówczas obydwa wirusy sprawnie rozprzestrzeniają się poprzez połączenia plazmodesmalne [2]. Transport cząstek wirusowych stosunkowo najlepiej poznano wśród RNA-wirusów u wirusa mozaiki tytoniu (TMV), natomiast wśród DNA-wirusów u geminowirusa mozaiki fasoli karłowatej (BDMV).

MIĘDZYKOMÓRKOWY TRANSPORT WIRUSA MOZAIKI TYTONIU (TMV)

RNA-wirusy przemieszczają się przez plazmodesmy jako całe wiriony (np. cowpea mosaic virus) [90], albo jako nukleoproteinowe kompleksy pozbawione białka kapsydu (np. TMV) [98]. Podstawowym czynnikiem umożliwiającym międzykomórkową infekcję TMV jest kodowane przez genom wirusa białko przemieszczające MP (ang. movement protein) [58]. Białko to zostało oczyszczone i zsekwencjonowane [16, 17]. Składa się ono z 268 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi około 30 kDa, stąd też znane jest jako proteina P30. Mikroiniekcja tego białka do pojedynczej komórki miększu liściowego tytoniu powoduje szybki wzrost SEL plazmodesm tej komórki oraz komórek otaczających (w czasie 1–5 minut) do wartości 15–20 kDa [98]. W warunkach infekcji wirusowej część tego białka pozostaje związana z plazmodesmami, część natomiast znajduje się w cytoplazmie [80]. Wpływ białka P30 na SEL plazmodesm uzależniony jest również od rodzaju zainfekowanych komórek. W przypadku komórek włosków liściowych tytoniu, białko P30

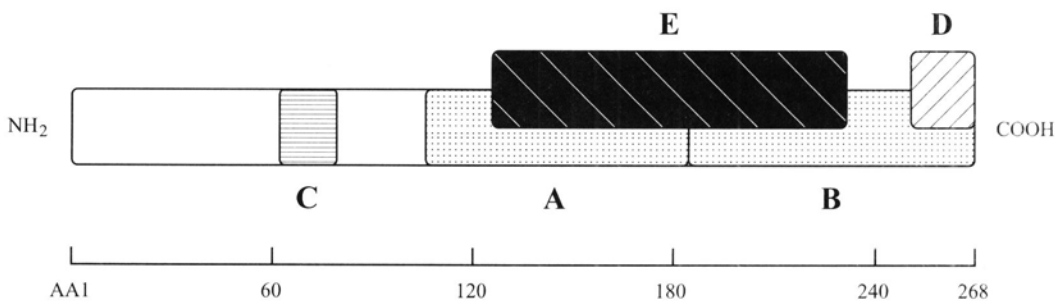
powoduje wzrost SEL ich plazmodesm jedynie do około 10 kDa [94].

Mutanty TMV posiadające zmienione białko P30 replikują się *in vivo* prawidłowo, pozbawione są jednak zdolności rozprzestrzeniania się w obrębie organizmu rośliny [60]. Natomiast transgeniczne rośliny tytoniu posiadające ulegający ekspresji gen dla białka P30, „odtworzą” zdolność infekcji międzykomórkowej tych mutantów [16].

Jaki jest zatem mechanizm funkcjonowania białka P30? Wydaje się, że białko to wiążąc się z kwasem nukleinowym, osłania go przed komórkowymi nukleazami i umożliwia transport całego kompleksu przez plazmodesmy [9]. Badania *in vitro* wykazały, że P30 wiąże jednoniciowe kwasy nukleinowe w sposób kooperatywny i niezależny od sekwencji nukleotydowej [9]. W odróżnieniu od innych znanych białek wiążących jednoniciowe kwasy nukleinowe, P30 wykazuje zbliżone powinowactwo do DNA i RNA [9]. Sugeruje się, iż *in vivo* z cząsteczką RNA wiąże się kompleks złożony z kilku białek P30 [7].

Analiza kompleksów P30-RNA w mikroskopie elektronowym wskazuje, że białko P30 posiada zdolność „rozwijania” cząsteczki RNA. Przed związaniem P30, cząsteczka wirusowego RNA posiada średnicę zbliżoną do 10 nm, po związaniu białka spada ona do około 2–3 nm [10]. Przypuszcza się, że jedynie w takiej rozwiniętej formie możliwy jest transport kompleksu P30-RNA przez plazmodesmy. Jednak w przypadku wirusa mozaiki goździka (ang. red clover mosaic virus) nie stwierdzono „rozwijającego” wpływu białka przemieszczającego na wirusowy RNA [30]. Być może w tym przypadku funkcję tę pełnią inne nieznanne czynniki komórkowe.

Choć nie jest znany mechanizm przepuszczalności plazmodesm, wiadomo że nie jest w tym celu konieczne uprzednie powstanie kompleksu P30-RNA. Metodą ukierunkowanej mutagenyzy analogicznego do P30 białka wirusa mozaiki goździka uzyskano jego formy o obniżonej zdolności wiązania RNA, choć ich zdolność do zwiększania wartości SEL pozostała nie zmieniona [33]. Powyższe badania wskazują



Ryc. 3. Schemat pierwszorzędowej budowy białka P30 uwzględniający lokalizację funkcjonalnych domen tego białka. A (112–185 aminokwasów) i B (185–268 aminokwasów) – domeny wiążące jednoniciowe kwasy nukleinowe; C (65–86 aminokwasów) – region warunkujący właściwą strukturę trzeciorzędową białka; D – region ulegający fosforylacji; E (126–224 aminokwasów) – domena odpowiedzialna za wzrost SEL plazmodesmy (wg [93]).

Fig. 3. The primary structure of the P30 protein covering the localization of functional domains. A (112–185 amino acids) and B (185–268 amino acids) – single-strand nucleic acids binding domains; C (65–86 amino acids) the important region for tertiary structure of the protein; D – the domain with phosphorylation sites; E (126–224 amino acids) – the domain involved in SEL increasing (after [93]).

jednocześnie, że wirusowe białka transportujące zawierają co najmniej trzy funkcjonalne domeny. Dwie z nich gwarantują kooperatywne wiązanie RNA, a trzecia jest odpowiedzialna za regulację przepuszczalności plazmodesm. Mutanty delecyjne P30 pozbawione 73 C-końcowych aminokwasów posiadają zdolność wiązania RNA, lecz nie są zdolne do modyfikowania przepuszczalności plazmodesm [31]. Z drugiej strony, mutanty delecyjne pozbawione jedynie 55 C-końcowych aminokwasów zachowują zdolność zwiększania SEL plazmodesm [31]. Dalsze badania sześciu różnych mutantów delecyjnych, pozwoliły ustalić w przybliżeniu położenie funkcjonalnych domen w białku P30 (Ryc. 3) [93]. Fragment białka P30 obejmujący aminokwasy 126–224 (Ryc. 3; domena E) wiąże się najprawdopodobniej z którymś z białek obecnych w plazmodesmie. Żadnego z tych białek dotychczas nie wyizolowano, jednak przypuszcza się, że jednym z nich jest kinaza serynowo-treoninowa [12].

Preparaty P30 izolowane ze ścian komórek dojrzałych liści są często fosforylowane w Ser-258, Thr-261 i Ser-265. Prawdopodobnie fosforylacja powoduje unieruchomienie P30 w plazmodesmie i obniżenie jego zdolności do zmiany SEL [11]. Młode liście tytoniu, niezdolne do

fosforylacji P30, są bardziej wrażliwe na infekcję wirusem TMV [14]. Izolacja P30 z młodych liści ujawnia jednocześnie, że większość tego białka znajduje się we frakcji cytoplazmatycznej (a więc nie jest związana ze ścianą).

Białko P30 jest jedynym kodowanym przez genom TMV białkiem promującym jego rozprzestrzenianie się. Prawdopodobnie nie jest jednak jedynym czynnikiem wymaganym do przebiegu tego procesu. Według ogólnie akceptowanego modelu zakłada się istnienie co najmniej dwóch czynników komórkowych (Ryc. 4). Jeden z nich umożliwiałby transport kompleksu P30-RNA z miejsca jego powstania do plazmodesmy, a drugi (będący integralnym składnikiem plazmodesmy) oddziaływałby z P30, co w konsekwencji zwiększałoby SEL określonej plazmodesmy [11]. Pomimo intensywnych badań, nie wyizolowano dotychczas cytoplazmatycznego czynnika umożliwiającego transport kompleksu P30-RNA do obszaru plazmodesmy. Jego istnienie sugerują mikroskopowe obserwacje kompleksów P30-RNA, które powstają w cytoplazmie, a nie w bezpośredniej bliskości plazmodesm [68]. Wydaje się, że czynnik ten może odpowiadać za specyficzne wiązanie białka P30 do elementów cytoszkieletu, gdyż powstawanie połączeń P30 z mikrotubulami

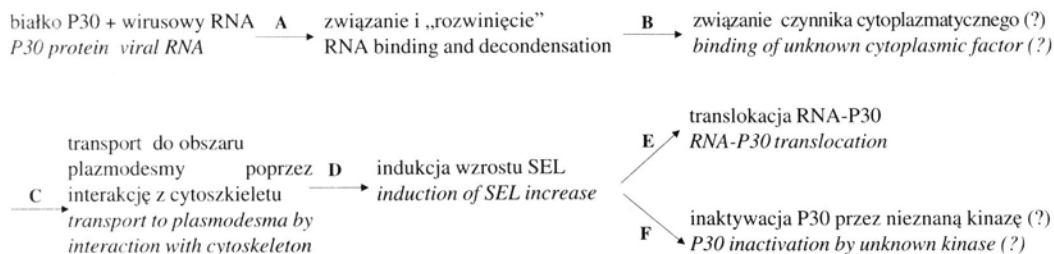


Fig. 4. Schemat międzykomórkowego transportu materiału genetycznego wirusa TMV (wg [12], opis w tekście).

Fig. 4. The scheme of cell-to-cell movement of TMV genetic material (after [12] – description in the text).

[38, 57] i filamentami aktynowymi [57] zostało ostatnio udokumentowane w protoplastach z liści tytoniu. Ponadto wiadomo również, że białko P30 – jak i inne tego rodzaju białka wirusowe – może z dużym powinowactwem wiązać GTP, lecz nie posiada prawdopodobnie aktywności hydrolitycznej w stosunku do tego nukleotydu [52]. Przypuszcza się, że dostarczany przez białko P30 nukleotyd jest hydrolizowany przez GTP-azę zlokalizowaną w plazmodesmie, co jest istotnym elementem procesu przemieszczenia. Warto zwrócić uwagę, że w badaniach grupy Heinleina [38], zamiast mikroiniekcji sond fluorescencyjnych wykorzystano infekcję protoplastów genetycznie zmienionym wirusem TMV oraz tobamowirusem Ob. W wirusach tych dokonano fuzji RNA dla wirusowego białka MP z sekwencją kodującą białko (pochodzące z meduzy *Aequorea victoria*) fluoryzujące w zielonym zakresie widma, po uprzednim wzbudzeniu światłem niebieskim [65]. Tak zmienione białko MP zachowuje swój wpływ na wartość SEL plazmodesm i jednocześnie jest łatwe do zlokalizowania w mikroskopie fluorescencyjnym.

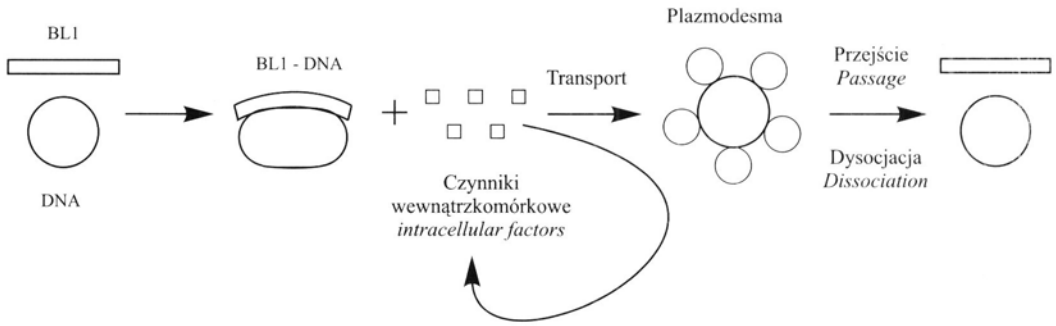
MIĘDZYKOMÓRKOWY TRANSPORT GEMINIWIRUSA MOZAIKI FASOLI KARŁOWATEJ (BDMV)

Geminiwirusy są jedyną znaną grupą wirusów roślinnych posiadającą genom w postaci jednociowego DNA. Większość geminiwirusów posiada dwuczęściowy genom, złożony z

podobnej wielkości (około 2.6 kb) kolistych cząsteczek DNA [74]. Cząsteczki te określa się jako DNA-A i DNA-B. DNA-A koduje białka odpowiedzialne za replikację i enkapsydację wirusa, natomiast DNA-B zawiera informację dotyczącą dwu białek transportujących (określanych jako BR1 i BL1) oraz konserwatywną sekwencję związaną z replikacją tej części genu wirusa [74].

Białko BR1 warunkuje transport wirusowego DNA pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą, natomiast białko BL1 umożliwia przemieszczanie się wirusowego DNA przez plazmodesmy do sąsiednich komórek [6, 90]. BL1 jest więc funkcjonalnym analogiem białka P30 wirusa TMV. Masa cząsteczkowa BL1, podobnie jak białka P30, zbliżona jest do 30 kDa. Wykazano również znaczne homologie sekwencji niektórych obszarów cząsteczek obydwu białek. Wyniki te sugerują, że geny kodujące białka transportujące przez plazmodesmy mogą wywodzić się z jednego wspólnego praprotenu, być może pochodzenia komórkowego [69]. Jeśli tak jest, można by wówczas uznać je za białka homologiczne.

Podobnie jak w przypadku wirusa TMV, niektóre mutanty wirusa BDMV pod względem białka BL1 wydajnie replikują się w hodowli tkankowej, lecz nie są zdolne do systematycznej infekcji [62]. Mikroiniekcja prawidłowego, wyznakowanego fluorochromem białka BL1, powoduje jego przemieszczanie się do sąsiednich komórek [40]. Towarzyszy temu wzrost SEL plazmodesm do wartości około 10 kDa. Sondy o



Ryc. 5. Schemat międzykomórkowego transportu materiału genetycznego roślinnych geminiwirusów (opis w tekście).

Fig. 5. The scheme of cell-to-cell movement of plant geminiviruses genetic material (description in the text).

masie 15–20 kDa, pomimo obecności BL1, nie przenikają przez plazmodesmy [58, 62]. Natomiast mikroiniekcja zmutowanej formy BL1 (pojedyncza substytucja $asn \rightarrow asp$ w pozycji 78) hamuje zdolności tego białka do przemieszczania się przez plazmodesmy. Znane są obecnie transgeniczne rośliny tytoniu z wbudowanym genem dla białka BL1, które wykazują symptomy infekcji wirusowej pomimo braku wirusowego DNA [69]. Prawdopodobnie jest to związane z zaburzeniem metabolizmu komórek, spowodowanym nadmierną przepuszczalnością plazmodesm dla metabolitów wewnątrzkomórkowych [69].

Cechą geminiwirusów jest przechodzenie przez plazmodesmy kwasów nukleinowych pozbawionych białka kapsydu [32]. Ostatnie badania wskazują, że formą transportowaną *in vivo* są kompleksy BL1 z dwuniciowym DNA wirusa [62]. Dotychczas brak dokładnych danych na temat tworzenia kompleksów DNA-BL1. Jednak fakt, że białko BL1 przemieszcza się przez plazmodesmy zarówno przy braku DNA wirusa, jak i promuje przemieszczanie się dwuniciowego DNA, sugeruje istnienie w nim co najmniej dwóch niezależnych domen [62]. Przez analogię do białka P30 wirusa TMV, jedna z tych domen odpowiadałaby za tworzenie kompleksu z DNA, a druga oddziaływałaby ze składnikiem plazmodesm. W efekcie dochodziłoby do zwiększenia SEL plazmodesmy i przejścia kompleksu BL1-DNA do sąsiedniej komórki (Ryc. 5). Rola

ewentualnych roślinnych czynników wewnątrzkomórkowych w chwili obecnej jest nieznana.

Warto podkreślić, iż niektóre grupy wirusów roślinnych (jak np. como-, nepo-, tospowirusy), rozprzestrzeniając się pomiędzy sąsiednimi komórkami, indukują powstawanie w ścianie komórkowej tubularnych struktur łączących sąsiednie protoplasty. Średnica tych struktur jest zbliżona do średnicy wirionu. Struktury te powstają niekiedy z plazmodesm, w których wirusy indukują degradację desmotubul [7].

POWSTAWANIE PLAZMODESM ORAZ ICH ROLA W PROCESIE RÓŻNICOWANIA

W komórkach roślinnych mogą występować plazmodesmy pierwotne oraz plazmodesmy wtórne. Plazmodesmy pierwotne są pochodzenia cytokinetycznego powstają w płaszczyźnie płytki środkowej pod koniec telofazy dzielących się komórek [39, 70]. Ich powstawanie związane jest z aktywnością aparatów Golgiego, wydzielających pęcherzyki wokół odpowiednio ukierunkowanych cystern retikulum endoplazmatycznego [39].

Plazmodesmy wtórne mogą powstawać w komórkach nie dzielących się [41]. Ich tworzenie wykazano między innymi na granicy międzygatunkowych przeszczepów u *Vicia* i *Helianthus* [46, 47], między komórkami pasożyta i rośliny-gospodarza [13], w trakcie regeneracji protoplastów *Solanum nigrum* [59] i w rozwii-

jąjących się komórkach macierzystych pyłku [8]. Podobnie jak w przypadku plazmodesm pierwotnych, nie jest znany dokładny mechanizm powstawania plazmodesm wtórnych. Wiadomo, że istotna dla tego procesu jest aktywność wydzielnicza aparatów Golgiego, których pęcherzyki odkładają materiał wokół miejsc, w których cysterny retikulum znajdują się bardzo blisko plazmalemy [46, 59]. Pęcherzyki Golgiego zawierają prawdopodobnie enzymy degradujące lokalnie ścianę komórkową. Z obserwacji mikroskopowych wynika, że początkowo powstają tzw. plazmodesmy połówkowe (ang. half-plasmodesmata), będące wynikiem aktywności jednej komórki [41, 59]. Cała plazmodesma powstaje gdy sąsiednia komórka dobuduje po przeciwnej stronie ściany brakującą „połówkę”. Pomimo odmiennego sposobu powstawania, ultrastruktura plazmodesm pierwotnych i wtórnych nie wykazuje zauważalnych różnic [59, 70].

Możliwość regulacji przepuszczalności i liczby plazmodesm sugeruje, że struktury te mogą stanowić istotny czynnik różnicowania organizmu roślinnego. Plazmodesmy uczestniczą w przekazywaniu błonowego impulsu elektrycznego, powstającego u roślin w odpowiedzi na szereg bodźców zewnętrznych, np. na zranienie [96]. Zakłada się ponadto, że przez plazmodesmy mogą migrować w sposób regulowany związki o charakterze przekaźników informacji [18, 54, 89]. Świadczą o tym m.in. obserwacje mówiące o obniżeniu liczby plazmodesm wraz ze wzrostem indeksu mitotycznego w stożkach wzrostu u *Silene* [76]. Różnicowaniu łodyg i liści u *Egeria densa* towarzyszą znaczne zmiany w przepuszczalności plazmodesm [25], a inicjacji tworzenia korzeni bocznych towarzyszy wzrost liczby połączeń międzykomórkowych poprzez plazmodesmy [66].

Obecnie wiadomo, że zmiana programu ekspresji genów wiąże się między innymi z powstawaniem lub/i zanikiem połączeń międzykomórkowych poprzez plazmodesmy. W powstających wokół tkanki przyrannej komórkach tumoru typu „crown gall” nie obserwuje się połączeń plazmodesmalnych z otaczającą tkanką [49]. Przyjmuje się, że izolacja plazmodesmowa

transformowanych komórek sprzyja wyłamaniu się ich spod kontroli organizmu i promuje rozwój nowotworu. Natomiast w przypadku glonu *Chara*, zanik połączeń poprzez plazmodesmy jest warunkiem przebiegu prawidłowej spermatogenezy [51]; ogranicza także transport kwasu gibberelowego w różnicujących się anterydiach [49]. Przejrzystym przykładem istotnej roli plazmodesm w różnicowaniu na poziomie organizmu może być doświadczenie, w którym przy pomocy plazmolizy zniszczono cytoplazmatyczne połączenia pomiędzy komórkami przedrośla paproci *Onoclea sensibilis*. W efekcie, izolowane komórki uzyskały totipotencję i każda z nich wytworzyła nowe przedrośle [83]. Innym dobrze udokumentowanym przykładem jest tworzenie plazmodesm wtórnych, prowadzące do synchronizacji rozwoju zrastających się owocolistków u *Catharanthus roseus* [73, 89]. W trakcie rozwoju słupka u wspomnianego gatunku wyodrębniają się początkowo dwa owocolistki, z których każdy otoczony jest własną epidermą. W czasie wzrostu owocolistków dochodzi do kontaktu, a następnie zrośnięcia komórek ich epidermy. Kontaktujące się ze sobą komórki epidermy ulegają odróżnicowaniu i przekształcają się w komórki parenchymatyczne. Jak wykazali van der Schoot i współautorzy [89], warunkiem tego procesu (a więc również prawidłowego rozwoju słupka) jest powstanie plazmodesm wtórnych pomiędzy kontaktującymi się komórkami epidermy.

PODSUMOWANIE

W porównaniu z wieloma innymi strukturami komórek roślinnych, plazmodesmy są stosunkowo słabo poznane. Z powodu ich niewielkich rozmiarów oraz umiejscowienia wewnątrz ścian komórkowych zawodzą w stosunku do nich metody klasycznej biochemii. Dlatego też izolacja makromolekuł charakterystycznych jedynie dla plazmodesm napotyka na ogromne trudności, a podstawowym narzędziem badania struktury plazmodesm pozostaje nadal wysokorozdzielczy mikroskop elektronowy. Wydaje się, że istotny postęp w kierunku poznania biochemicznej natury plazmodesm mogą przynieść

badania nad mutantem kukurydzy sed1, u którego zaburzony transport sacharozy z liści związany jest ze zmienioną budową plazmodesm występujących w określonym typie komórek.

Istotny postęp w zakresie funkcjonowania plazmodesm wnoszą obecnie badania białek warunkujących międzykomórkowe przenikanie wirusów roślinnych. Wyniki tych badań skłaniają do przypuszczenia, że komórki roślinne mogą zawierać zestaw białek regulujących przepuszczalność plazmodesm i w ten sposób umożliwiać międzykomórkowy transport makromolekuł. Jedynym poznanym dotychczas roślinnym białkiem wpływającym na przepuszczalność plazmodesm jest produkt genu *KNOTTED 1*. Białko to jest równocześnie wiążącym się z DNA czynnikiem transkrypcyjnym, wpływającym na różnicowanie komórek merystematycznych u kukurydzy. Stanowi to dowód na udział połączeń plazmodesmalnych w różnicowaniu i morfogenezie organizmu roślinnego. Stąd też dalsze badania w tym zakresie zapowiadają się niezwykle interesująco.

Ze względu na długi cykl wydawniczy praca nie obejmuje wyników najnowszych badań nt. budowy i funkcji plazmodesm. Autor szczególnie poleca artykuł przeglądowy w *Ann. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1997) **48**: 27–50.

LITERATURA

- [1] ATABEKOV J. G., DOROKHOV Y. L. 1984. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. *Adv. Virus. Res.* **29**: 313–363.
- [2] ATABEKOV J. G., TALIANSKY M. E. 1990. Expression of plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus. Res.* **38**: 201–248.
- [3] BARON-EPEL O., HERNANDEZ D., JIANG L. W., MEINERS S., SCHINDLER M. 1988. Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. *J. Cell. Biol.* **106**: 715–721.
- [4] BEEBE D. U., TURGEON R. 1991. Current perspectives on plasmodesmata: structure and function. *Physiol. Plant.* **83**: 194–199.
- [5] BERTL A., FELLE H. 1985. Cytoplasmic pH of root hair cells of *Sinapis alba* by a pH-sensitive microelectrode. Does fusicoccin stimulate the proton pump by cytoplasmic acidification? *J. Exp. Bot.* **36**: 1142–1149.
- [6] BROUGH C. L., HAYES R. J., MORGAN A. J., COUTTS R. H., BUCK K. W. 1988. Effects of mutagenesis *in vitro* on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* **69**: 503–514.
- [7] CARRINGTON J. C., KASSCHAU K. D., MAHAJAN S. K., SCHAAD M. C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**: 1669–1681.
- [8] CHENG K. C., NIE X. W., CHEN S. W., JIANG L. C., SUN L. H., SUN D. L. 1987. Studies on the secondary formation of plasmodesmata between pollen mother cells of lily before cytomeiosis. *Acta Biol. Exp. Sinica* **20**: 1–11.
- [9] CITOVSKI V., KNORR D., SCHUSTER G., ZAMBRYSKI P. 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**: 637–647.
- [10] CITOVSKI V., WONG M. L., SHAW A. L., PRASAD B. V. V., ZAMBRYSKI P. 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**: 397–411.
- [11] CITOVSKI V. 1993. Probing plasmodesmal transport with plant viruses. *Plant Physiol.* **102**: 1071–1076.
- [12] CITOVSKI V., ZAMBRYSKI P. 1993. Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 167–197.
- [13] CLELAND R. E., FUJIWARA T., LUCAS W. J. 1994. Plasmodesmal-mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress. *Protoplasma* **178**: 81–85.
- [14] CULVER J. N., DAWSON W. O. 1991. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 458–463.
- [15] DELL B., KUO J., BURBIDGE H. H. 1982. Anatomy of *Ptilostyles hamiltonii* (*Rafflesiaceae*) on stems of *Daviesia*. *Austral. J. Bot.* **30**: 1–9.
- [16] DEOM C. M., SHAW M. J., BEACHY R. N. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **327**: 389–394.
- [17] DEOM C. M., SCHUBERT K., WOLF S., HOLT C., LUCAS W. J., BEACHY R. N. 1990. Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3284–3288.
- [18] DING B., TURGEON R., PARTHSARATHY M. V. 1992. Substructure of freeze substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169**: 28–41.
- [19] DING B., HAUDENSHIELD J. S., HULL R. J., WOLF S., BEACHY R. N., LUCAS W. J. 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**: 915–928.
- [20] DOROKHOV Y. L., ALEXANDROVA N. M., MIROSNICHENKO N. A., ATABEKOV J. G. 1983. Isolation and analysis of virus-specific ribonucleoprotein of tobacco mosaic virus-infected tobacco. *Virology* **127**: 237–252.
- [21] EPEL B. L., ERLANGER M. A. 1991. Light regulates symplastic communication in etiolated corn seedlings. *Physiol. Plant.* **83**: 149–153.
- [22] EPEL B. L. 1994. Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Molec Biology* **26**: 1343–1356.
- [23] EPEL E. L., sc LENT J. M. W., COHEN L., KOTLIZKY G., KATZ A., YAHALOM A. 1996. A 41-kDa protein from

- maize mesocotyl cell walls immunolocalizes to plasmodesmata. *Protoplasma* **191**: 70–78.
- [24] ERWEE M. G., GOODWIN P. B. 1983. Characterisation of the *Egeria densa* Planch. leaf symplast. Inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group II ions. *Planta* **158**: 320–328.
- [25] ERWEE M. G., GOODWIN P. B. 1985. Symplast domains in extrastellar tissues of *Egeria densa* Planch. *Planta* **163**: 9–19.
- [26] FINK J., JEBLICK W., BLASCHEK W., KAUSS H. 1987. Calcium ions and polyamines activate the plasma membrane-located 1,3- β -glucan synthase. *Planta* **171**: 130–135.
- [27] FISHER D. B., WU Y., KU M. S.B. 1992. Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. *Plant Physiol.* **100**: 1433–1441.
- [28] FLEURAT-LESSARD P., BOUCHE-PILLON S., LELOUP C., LUCAS W. J., SERRANO R., of the BONNEMAIN J-L. 1995. Absence of plasma membrane H⁺-ATPase in plasmodesmata located in pit-fields young reactive pulvinus of *Mimosa pudica* L. *Protoplasma* **188**: 180–185.
- [29] FRANCESCHI V. R., LUCAS W. J. 1982. The relationship of the charasome to chloride uptake in *Chara corallina*: physiological and histochemical investigations. *Planta* **164**: 172–178.
- [30] FUJIWARA T., GIESMAN-COOKMEYER D., DING B., LOMMEL S. A., LUCAS W. J. 1993. Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus movement protein. *Plant Cell* **5**: 1783–1794.
- [31] GAFFNY R., LAPIDOT M., BERNA A., HOLT C. A., DEOM C. M., BEACHY R. N. 1992. Effects of terminal deletion mutations on function of the movement protein of tobacco mosaic virus. *Virology* **187**: 499–507.
- [32] GARDINER W. E., SUNTER G., BRAND L., ELMER J. S., ROGERS S. G., BISARO D. M. 1988. Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: the coat protein is not required for systemic spread or symptom development. *EMBO J.* **7**: 899–904.
- [33] GIANQUINTA R. T., LIN W., SADLER N. L., FRANCESCHI V. R. 1983. Pathway of phloem unloading of sucrose in corn roots. *Plant Physiol.* **72**: 362–367.
- [34] GIESMAN-COOKMEYER D., LOMMEL S. A. 1993. Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* **5**: 973–982.
- [35] GILROY S., HUGHES W. A., TREWAVAS A. J. 1989. A comparison between quin-2 and aequorin as indicators of cytoplasmic calcium levels in higher plants cell protoplasts. *Plant Physiol.* **90**: 482–491.
- [36] GOODWIN P. B. 1983. Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elodea* leaf. *Planta* **157**: 124–130.
- [37] GRABSKI S., de FEIJTER A. W., SCHINDLER M. 1993. Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells. *Plant Cell* **5**: 25–38.
- [38] GROTHA R. 1986. Tetracyclines, verapamil and nifedipine induce callose deposition at specific cell sites in *Riella helicophylla*. *Planta* **169**: 546–554.
- [39] HEINLEIN M., EPEL B. L., PADGETT H. S., BEACHY R. N. 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**: 1983–1984.
- [40] HEPLER P. 1982. Endoplasmic reticulum in the formation of the cell plate and plasmodesmata. *Protoplasma* **111**: 121–133.
- [41] HULL R. 1989. The movement of viruses in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 213–240.
- [42] JONES M. G.K. 1976. The origin and development of plasmodesmata. (W:) B. S. GUNNIG, A. W. ROBARDS (red.), *Intercellular communication in plants: Studies on plasmodesmata*. New York, Springer-Verlag, s. 81–105.
- [43] JUNIPER B. E., BARLOW P. W. 1969. The distribution of plasmodesmata in the root tip of maize. *Planta* **89**: 352–360.
- [44] KEMPEERS R., PRIOR D. A.M., van BELL A. J.E., OPARKA K. J. 1993. Plasmodesmata between sieve element and companion cell of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant J.* **4**: 567–575.
- [45] KIKUYAMA M., TAZAWA M. 1982. Ca²⁺ ions reversibly inhibits the cytoplasmic streaming of *Nitella*. *Protoplasma* **113**: 241–243.
- [46] KIKUYAMA M., HARA Y., SHIMADA K., YAMAMOTO K., HIRAMOTO Y. 1992. Intercellular transport of macromolecules in *Nitella*. *Plant Cell Physiol.* **33**: 413–417.
- [47] KOLLMANN R., GLOCKMANN C. 1985. Studies on graft unions. I. Plasmodesmata between cells of plants belonging to different unrelated taxa. *Protoplasma* **124**: 224–235.
- [48] KOLLMANN R., GLOCKMANN C. 1991. Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *Protoplasma* **165**: 71–85.
- [49] KOTLIZKY G., SHURTZ S., YAHALOM A., MALIK Z., TRUBUB O., EPEL B. L. 1992. An improved procedure for the isolation of plasmodesmata embedded in clean maize cell walls. *Plant J.* **2**: 623–630.
- [50] KWIATKOWSKA M., RENNERT A., SZKOPEK M. 1988. Zmiany w systemie połączeń plazmodesmowych komórek związane z rozwojem tumora „crown gall”. IV Ogólnopolska Konferencja Mechanizmy Regulacji Morfogenezy Układów Roślinnych, Rogów, ss. 140.
- [51] KWIATKOWSKA M. 1991. Autoradiographic studies on the role of plasmodesmata in the transport of gibberellin. *Planta* **183**: 294–299.
- [52] KWIATKOWSKA M., MALINOWSKI S. 1995. The influence of the disappearance of plasmodesmal connections between antheridia and thallus on ³H-GA₃ transport. *Folia Histochem. Cytobiol.* **33**: 53–55.
- [53] LI Q., PALUKAITIS P. 1996. Comparison of the nucleic acid – and NTP-binding properties of the movement proteins of cucumber mosaic virus cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* **216**: 71–79.
- [54] LOPEZ-SAEZ J. F., GIMENEZ-MARTIN G., RISUENO M. C. 1966. Fine structure of the plasmodesm. *Protoplasma* **61**: 81–84.
- [55] LUCAS W. J., DING B., VAN DER SCHOOT C. 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* **125**: 435–476.

- [56] LUCAS W. L., BOUCHE-PILLON S., JACKSON D. P., NGUYEN L., BAKER L., DING B., HAKE S. 1995. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**: 1980–1983.
- [57] LUTTGE U., HIGINBOTHAM N. 1979. Transport in plants. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York ss. 350.
- [58] MCLEAN B. G., ZUPAN J., ZAMBRYSKI P. C. 1995. Tobacco mosaic movement protein associates with cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**: 2101–2114.
- [59] MESHİ T., WATANABE Y., SAİTO T., SUGIMOTO A., MAEDA T., OKADA Y. 1987. Function of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J.* **6**: 2557–2553.
- [60] MONZER J. 1991. Ultrastructure of secondary plasmodesmata formation in regenerating *Solanum nigrum*-protoplast cultures. *Protoplasma* **165**: 86–95.
- [61] MUSHEGIAN A. R., KOONIN E. V. 1993. The proposed plant connexin is a protein kinase-like protein. *Plant Cell* **5**: 998–999.
- [62] NISCHIGUCHI M., MOTYOYOSHI F., OSHIMA M. 1978. Behavior of a temperature sensitive strain of tobacco mosaic virus in tomato leaves and protoplasts. *J. Gen. Virol.* **39**: 53–61.
- [63] NOUEIRY A. O., LUCAS W. J., GILBERTSON R. L. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**: 925–932.
- [64] OLESEN P. 1979. The neck construction in plasmodesmata; the evidence for a peripheral sphincter – like structure revealed by fixation with tannic-acid. *Planta* **144**: 349–358.
- [65] OLESEN P. 1986. Interactions between cell wall and plasmodesmata: model of a possible sphincter mechanism. (W:) B. VIAN, D. REIS, R. GOLDBERG (red.), *Cell Wall* 1986. Univ. Pierre and Marie Curie, Paris, s. 292–295.
- [66] OPARKA K. J., ROBERTS A. G., PRIOR D. A.M., CHAPMAN S., BAULCOMBE D., SANTA CRUZ S. 1995. Imaging the green fluorescent protein in plants – viruses' carry the torch. *Protoplasma* **189**: 133–141.
- [67] OPARKA K. J., PRIOR D. A.M., WRIGHT K. M. 1995. Symplastic communication between primary and developing lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **283**: 187–197.
- [68] OVERALL R. L., WOLFE J. G., GUNNING B. E.S. 1982. Intercellular communications in *Azolla* roots. I. Ultrastructure of plasmodesmata. *Protoplasma* **111**: 134–150.
- [69] PALIKAITIS P., ZAITLIN M. 1986. Tobacco mosaic virus: infectivity and replication. (W:) H. FRAENKEL-CONRAT (red.), *The rod-shaped viruses*. Plenum Press, New York, s. 27–44.
- [70] PASCAL E., GOODLOVE P. E., WU L. C., LAZAROWITZ S. G. 1993. Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell* **5**: 795–807.
- [71] ROBARDS A. W., LUCAS W. J. 1990. Plasmodesmata. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **41**: 369–419.
- [72] RUSSIN W. A., EVERT R. F., VAN DER VEER P. J., SHARKEY T. D., BRIGGS S. P. 1996. Modification of specific class of plasmodesmata and sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *Plant Cell* **8**: 645–658.
- [73] SAMUEL G. 1934. The movement of tobacco mosaic virus within the plant. *Ann. Appl. Biol.* **21**: 90–111.
- [74] SIEGEL B. A., VERBEKE J. A. 1989. Diffusible factors essential for epidermal cell redifferentiation in *Catharanthus roseus*. *Science* **244**: 580–582.
- [75] STANLEY J. 1991. The molecular determinants of geminivirus pathogenesis. *Sem. Virol.* **2**: 139–150.
- [76] STITT M. 1996. Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: A step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* **8**: 565–571.
- [77] SANTIAGO J. F., GOODWIN P. B., 1988. Restricted cell/cell communication in the shoot apex of *Silene coeli-rosa* during the transition to flowering is associated with a high mitotic index rather than with evocation. *Protoplasma* **146**: 52–60.
- [78] TERRY B. R., ROBARDS A. W. 1987. Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* **171**: 145–157.
- [79] THOMSON W. W., PLATT-ALOIA K. 1985. The ultrastructure of the Plasmodesmata of the salt glands of *Tamarix* revealed by transmission and freeze-fracture electron microscopy. *Protoplasma* **125**: 13–23.
- [80] TILNEY L. G., COOKE T. J., COONELLY P. S., TILNEY M. S. 1991. The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction and protease digestion. *J. Cell Biol.* **112**: 739–748.
- [81] TOMENIUS K., CLAPHAM D., MESHİ D. 1987. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* **160**: 363–371.
- [82] TUCKER E. B. 1982. Translocation in the staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. I. A study of cell ultrastructure and cell-to-cell passage of molecular probes. *Protoplasma* **113**: 193–201.
- [83] TUCKER E. B. 1988. Inositol bisphosphate and inositol trisphosphate inhibit cell-to-cell passage of carboxy-fluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta* **174**: 358–363.
- [84] TUCKER E. B. 1990. Analytical studies of dye-coupling between plant cells. (W:) A. W. ROBARDS, W. J. LUCAS, J. D. PITTS, H. J. JONGSMA, D. C. SPRAY (red.), *Parallels in cell to-cell junctions in plants and animals*. (NATO ASI series v. H46). Springer-Verlag Berlin, s. 239–248.
- [85] TUCKER E. B. 1990. Calcium-loaded 1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid blocks cell-to-cell diffusion of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta* **182**: 34–38.
- [86] TUCKER E. B., TUCKER J. B. 1993. Cell-to-cell diffusion selectivity in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Protoplasma* **174**: 36–44.
- [87] TUCKER E. B. 1993. Azide treatment enhances cell-to-cell diffusion in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Protoplasma* **174**: 45–49.
- [88] TUCKER E. B., BOSS W. F. 1995. Intracellular Ca²⁺ fluxes may regulate cell-to-cell communication. *Plant Physiol.* **108**(Suppl.): 100.

- [89] TURNER A., WELLS B., ROBERTS K. 1994. Plasmodesmata of maize root tips: structure and composition. *J. Cell Sci.* **107**: 3351–3361.
- [90] VAN DER SCHOOT C., DIETRICH M. A., STORMS M., VERBEKE J. A., LUCAS W. J. 1995. Establishment of a cell-to-cell communication pathway between separate carpels during gynoecium development. *Planta* **195**: 450–455.
- [91] VAN LENT J., STORMS M., VAN DER MEER F., WELLINK J., GOLDBACH R. 1991. Tubular structures involved in the movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *J. Gen. Virol.* **72**: 2615–2623.
- [92] VAUGHAN D. K., LASATER E. M. 1990. Distribution of F-actin in bipolar and horizontal cells of bass retinas. *Am. J. Physiol.* **259**: 205–214.
- [93] VON ARNIM A., STANLEY J. 1992. Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* **186**: 286–293.
- [94] WAIGMAN E., LUCAS W. J., CITOVSKI V., ZAMBRYSKI P. 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1433–1437.
- [95] WAIGMAN E., ZAMBRYSKI P. 1995. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* **7**: 2069–2079.
- [96] WHITE R. G., BADEL K., OVERALL R. L., VESK M. 1994. Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* **180**: 169–184.
- [97] WILDON D. C., THAIN J. F., MINCHIN P. E.H., GUB I. R., REILLY A. J., SKIPPER I. D., DOHERTY H. M., O'DONELL P. J., BOWLES D. J. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360**: 62–65.
- [98] WILLISON J. H.M. 1976. Plasmodesmata: a freeze-fracture view. *Can. J. Bot.* **54**: 2842–2847.
- [99] WOLF S., DEOM C. M., BEACHY R. N., LUCAS W. J. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmal size exclusion limit. *Science* **246**: 377–379.
- [100] YAHALOM A., WARMBRODT R. D., LAIRD D. W., TRAUB O., REVEL J. P., WILLECKE K., EPEL B. L. 1991. Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *Plant Cell* **3**: 407–417.
- [101] ZAMBRYSKI P. 1995. Plasmodesmata: plant channels for molecules on the move. *Science* **270**: 1943–1944.