

Viroidlerde Çoğalma (Replikasyon)

H. Murat Sipahioğlu¹, Semih Erkan², Mustafa Gümüş³

Özet

Viroidler çok sayıda tarımsal bitkide önemli düzeyde ürün kayıplarına neden olabilen düşük molekül ağırlığına sahip tek zincir şeklindeki RNA molekülleridir. Viroidlerin bir kısmı bitkilerde belirti oluşturmadan bulunurlarken, bazı viroidlerin enfekte ettiği bitkilerde cücelik, yaprak, çiçek ve meyvelerde lekeler, şekil ve renk bozulmaları, dal ve gövdede çukurluklar, şişme ve zamklanma, gelişme geriliği, sararma, çalılışma ve ölüm gibi semptomlara neden olduğu görülmektedir. Bugüne kadar saptanan viroid kökenli etmenler genel olarak *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* adlı iki familya içerisinde kümelenmiş durumdadır. Bu familyalardaki viroidlerin moleküler yapıları, konukçu dizinleri, taşınma şekilleri ve diğer bazı özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konulmuştur. Buna karşın, viroidlerin hem küçük olmaları ve hem de protein kodlama yeteneklerinin bulunmayışı nedenleriyle çoğalmaları (replikasyonları) tamamen konukçu hücreye bağımlı olmaktadır. Değişik genom yapısına sahip *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyası üyeleri çoğalmaları (replikasyon) yönünden farklı biçimde davranışlar göstermektedirler. Bu farklılıklar; viroidlerin hücresel lokalizasyonlarını, çoğalma şekillerini, çoğalmada görev alan enzimleri (kendi kendine kesimi regüle eden ribozimler dahil) ve replikasyonda görev alan spesifik RNA dizilerini (motiflerini) kapsamaktadır. Bu makalede, adı geçen iki familya içinde yer alan viroidlerin çoğalmaları, replikasyon yerleri ve mekanizmaları dikkate alınarak karşılaştırmalı bir biçimde sunulmaktadır.

GİRİŞ

Daha önceleri bir virüsün neden olduğu düşünülen Patates iç yumru hastalığının etmenini arıtmak ve bazı özelliklerini belirlemek amacıyla 1967 yılında yapılan çalışmalar sırasında; etmenin düşük bir çökelti katsayısına sahip olduğu, ribonükleaz enziminden etkilenmesine karşın deoksiribonükleaz enzimi ile fenol, kloroform, butanol ve etanol uygulamalarına karşı reaksiyon vermediği görülmüştür. Bu özellikleri nedeniyle, adı geçen etmenin nükleotid sayısı az ve serbest bir ribonükleik asit (RNA) molekülü olduğu sonucuna varılmıştır. Fiziksel ve kimyasal ölçütleri ortaya konulduğunda, *Potato spindle tuber viroid (PSTVd)* olarak adlandırılan bu etmendeki gibi düşük molekül ağırlığına sahip olan ve protein kılıf içermeyen enfeksiyöz RNA'leri, protein kılıfa sahip oldukları bilinen virüslerden ayırt edebilmek için *viroid* teriminin kullanılması önerilmiştir (1-3).

¹ Doç. Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 65080 Van. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi : hmsipahi@yyu.edu.tr ² Prof. Dr., ³ Doç. Dr., Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova-İzmir

Daha sonra, 1972 yılında *Citrus exocortis viroid (CEVd)* ve 1973 yılında ise *Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)* adlı etmenlerin bitki patojenleri arasında viroid olarak tanısı yapılmıştır. Günümüze dek nükleotid dizisi ve yapısı karakterize edilen 30'un üzerinde viroid türü genelde *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* adlı iki familya içinde yer almaktadır (4-6).

Virüslerle kıyaslandıkları zaman viroidlerin;

- daha küçük boyutta genoma sahip olması,
- herhangi bir protein molekülünü kodlama özelliğinin olmaması,
- belirli koşullarda ribozim etkinliğinin bulunması,
- hücrel RNA'ni kullanarak çoğalması

gibi farklılıkların olduğu görülmektedir.

Viroidler yalnızca yüksek bitkilerde enfeksiyon oluşturmaktadırlar. Viroidlerin bir kısmı bitkilerde hiçbir belirti oluşturmazken ya da çok az düzeyde bir zarara neden olurken, bazı viroidler tehlikeli ve tahripkâr bitki hastalıklarının gelişmesinde önemli sorumluluklar üstlenmektedir. Viroidlerin dünyada birçok ülkede özellikle patates, domates, patlıcan, şerbetçiotu, Hindistan cevizi, avokado, turunçgiller, asma, şeftali, elma, armut, krizantem ve bazı süs bitkileri başta olmak üzere çok sayıda bitki türünde bulunduğu ve önemli düzeyde ekonomik kayıplara neden olabildiği belirtilmektedir (7-9).

En küçük viroid olma özelliğine sahip olan *Coconut cadang cadang viroid (CCCVd)* adlı etmenin enfeksiyonu nedeniyle 1926-1982 yılları arasında yaklaşık olarak 30 milyon Hindistan cevizi ağacının öldüğü ve bu viroidin yalnızca Filipinler'de her yıl 500.000 ağacın ölmesine neden olduğu bildirilmektedir (10). *Avocado sunblotch viroid (ASBVd)* ile enfekteli olan bitkilerin % 27 ile 95 arasında değişen oranda daha az meyve oluşturdıkları ve bu meyvelerin % 50'den fazlasında ise kalitenin iyi olmadığı ifade edilmektedir (11, 12). *Hop stunt viroid (HSVd)*'nin 1968 yılında Japonya'da şerbetçiotu yetiştirilen alanların %17'sinde bulunduğu, bazı plantasyonlarda enfekteli bitki sayısının %60 düzeyine ulaştığı ve verim kaybının ise % 60 ile 75 arasında değiştiği açıklanmaktadır (13).

Viroidlerin konukçu dizini genişliği yönünden farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Genel olarak, *Avsunviroidae* familyasındaki viroidlerin *Pospiviroidae* familyasının üyesi olan çok sayıda viroidten daha az ve sınırlı sayıda bir konukçu dizinine sahip oldukları belirtilmektedir (6, 7).

Viroidler genel olarak bitkilerde virus hastalıkları ile benzerlik gösteren belirtiler ortaya koymaktadırlar. Viroidlerin bitkilerde neden oldukları belirtilerin, bazen fizyolojik stress faktörlerinden kaynaklanan semptomlarla karıştırılması da söz konusu olmaktadır. Viroidlerin konukçularında ortaya koydukları belirtiler bitki türü ve çeşidine, viroidin irkına ya da varyantına, ortam koşullarına, bitkilerin beslenme dengesine ve bitkilerde viroidlerin tek başına veya birlikte bulunma durumlarına göre değişkenlik göstermektedir. Cücelik ya da bodurlaşma birçok viroid hastalığının en belirgin semptomudur. Cücelik yaprak boyutunda azalma ve nodyumların kısılması olarak tanımlanmaktadır. Viroidlerin bitkilerde ortaya koydukları cücelik dışındaki diğer belirtiler arasında; yaprak, çiçek ve meyvelerde lekeler, şekil ve renk bozulmaları, dal ve gövdede çukurluklar, şişme ve zamklanma, bitkide gelişme geriliği, sararma, çalılışma ve ölüm bulunmaktadır (7). Bazı viroidlerin doğal konukçularında herhangi bir belirti oluşturmada bulunabildikleri saptanmıştır.

Bu tip semptomsuz bitkilerin viroid enfeksiyonunun başlamasında inokulum görevini üstlenmeleri açısından önemi vardır.

Bugün viroidler ekonomik önemi olan çok sayıda hastalığa neden olmaları ve enfeksiyöz hastalık etmeni olarak en küçük patojen grubunu oluşturmaları nedenleriyle de ayrı bir ilgiye sahiptirler. Kılıf proteinine sahip virüslerin çoğunun bitki içinde hücreden hücreye yavaş hareket etmesine karşın, viroidlerin konukçu içinde hızlı hareket ettikleri ve floemde oldukça çabuk ilerleyebildikleri açıklanmaktadır.

Viroidlere yönelik olarak merak edilen konuların başında, konukçu hücre içinde nasıl çoğaldıkları gelmektedir. Zira, bu alanda ulaşılabilecek olan bilgiler ve bulgular onlarla yapılacak mücadelede önemli ip uçları edinmeyi sağlayacaktır.

Viroidlerin Çoğalma Mekanizmaları

Bugüne kadar saptanan viroid kökenli etmenler genel olarak iki familya içerisinde kümelenmiş bulunmaktadır. Bunların ilki, temsili üyesi *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) olan *Pospiviroidae* familyasıdır. Bu familya üyelerinin genomlarında merkezi korunmuş bölge (Central Conserved Region, CCR) bulunmaktadır. Üyelerinin çoğu hücre içerisinde çubuk şeklinde ikincil yapı oluşturmaktadır. Diğer ise, grubu temsil eden üyesi *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) olan *Avsunviroidae* familyasıdır. Bu familya üyelerinin genomlarında CCR bulunmamakta, ancak her iki polaritedeki (pozitif ya da negatif) grup üyeleri çekiç başlı ribozim oluşturma yeteneğine sahip bulunmaktadır. Bu familyadaki üyeler hücre içerisinde dallanmış küre ya da tamamen dallanmış ikincil yapı oluşturma özelliğine sahiptirler (7).

Viroidlerin hem küçük olmaları ve hem de protein kodlama yeteneklerinin bulunmamasından ötürü replikasyonları tamamen konukçu hücreye bağımlıdır. Ayrı genom yapısına sahip *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyası üyeleri farklı replikasyon davranışları sergilemektedirler. Bu farklılıklar viroidlerin hücresel lokalizasyonlarını, replikasyon şekillerini, replikasyonda görev alan enzimleri (kendi kendine kesimi regüle eden ribozimler dahil) ve replikasyonda görev alan spesifik RNA dizilerini (motiflerini) kapsamaktadır (Çizelge 1) (14).

Çizelge 1. *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyaları üyelerinin temel özellikleri (14)

Özellik	<i>Pospiviroidae</i>	<i>Avsunviroidae</i>
İkincil yapısı	Çubuk şekilli	Dallanmış küre yada tamamen dallanmış ikincil yapı
Genom üzerindeki korunmuş diziler	Var (CCR, TCH veya TCR)	Yok
Replikasyon yeri	Çekirdek	Kloroplast
Replikasyon şekli	Asimetrik çoğalma şekli	Simetrik çoğalma şekli
Replikasyon enzimleri	DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi	Çekirdekte-kodlu (klorplastik DNA polimeraz ve/veya kloroplasta kodlanan RNA polimeraz
Kesim	Kendi kendine kesim bölgesi içermez	Çekiç başı şeklindeki RNA yapıları yardımı ile kendi kendine kesim
Konukçu sayısı	Orta	Az

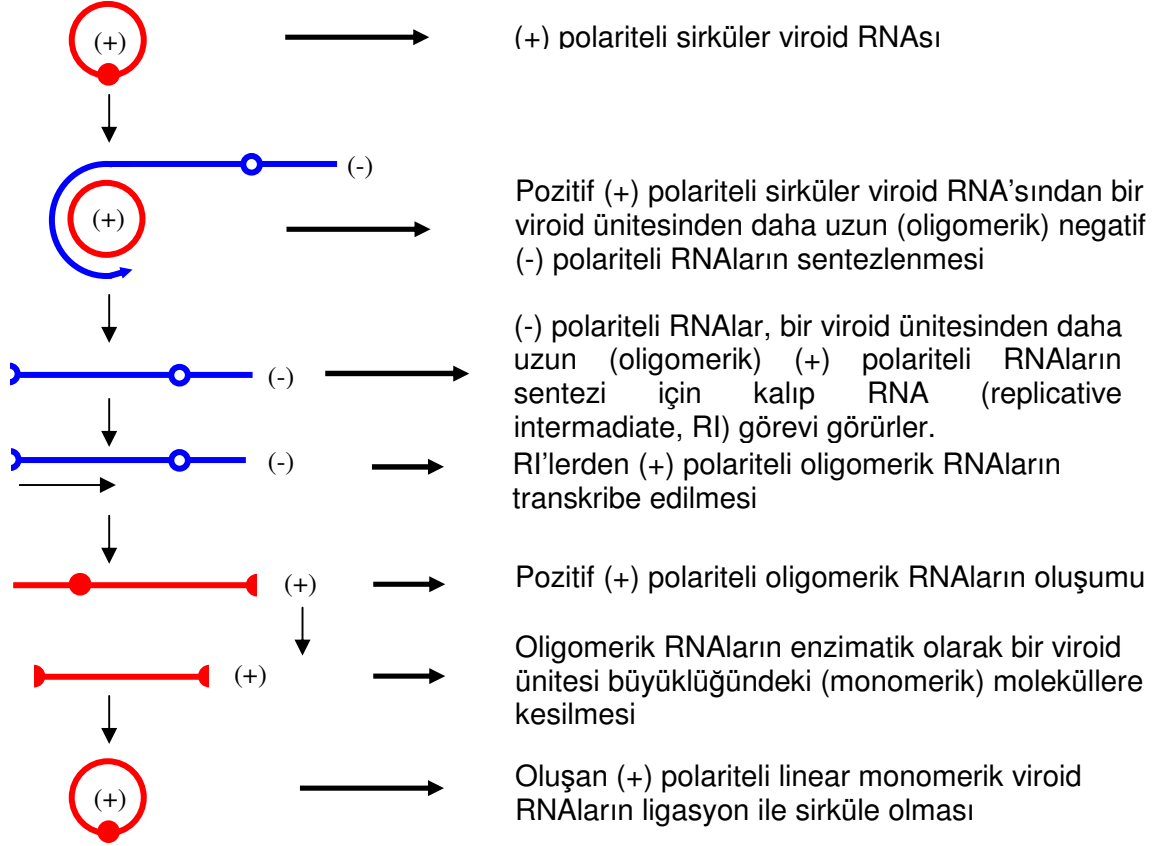
Çoğalmadaki bu farklılıklardan ilki, *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyası üyelerinin farklı hücresel organellerde replike olmalarıdır. *In situ* hibridizasyon ve hücre kesiti çalışmaları *Pospiviroidae* familyası üyelerinin nükleusta, *Avsunviroidae* familyası üyelerinin ise kloroplastlarda çoğaldıklarını ortaya koymuştur (14, 15).

İkinci farklılık ise, replikasyon şeklinde ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar adı geçen iki familyanın üyeleri yuvarlanan çember (rolling circle) modeli ile çoğalsalar da *Pospiviroidae* familyası üyeleri bu model içerisinde asimetric, *Avsunviroidae* üyeleri ise simetric şekilde çoğalmaktadır (14). *Pospiviroidae*'lerde pozitif (+) polariteli sirküler viroid RNA'nden ilk olarak bir viroid ünitesinden daha uzun (oligomerik) negatif (-) polariteli RNA'lerin sentezi gerçekleşmektedir. Oluşan (-) polariteli RNA'ler, yine bir viroid ünitesinden daha uzun (oligomerik) (+) polariteli RNA'lerin sentezi için kalıp RNA (replicative intermediate, RI) görevi görmektedirler. RI'lerden oluşan (+) polariteli oligomerik RNA'ler daha sonra enzimatic olarak bir viroid ünitesi büyüklüğündeki moleküllere (monomerik) kesilmektedir. Oluşan (+) polariteli doğrusal (linear) şekilli monomerik viroid RNA'leri daha sonra ligasyon ile sirküle olmaktadır (Şekil 1).

Avsunviroidae'lerde ise sirküler (+) polariteli viroid RNA'nden, linear (-) polariteli oligomerik RNA molekülleri sentezlenmektedir. Oluşan (-) polariteli oligomerik RNA daha sonra viroid ünitesi büyüklüğündeki parçalara bölünmekte ve sirküle olmaktadır. Sirküler (-) polariteli RNA'ler, (+) polariteli linear oligomerik RNA'lerin oluşumu için kalıp görevi görmektedir. Bu kalıptan sentezlenen (+) polariteli linear oligomerik RNA'ler ise enzimatic olarak viroid ünitesi büyüklüğünde olan monomerlere kesilmekte ve sirküle olmaktadır (14, 15) (Şekil 2).

Üçüncü farklılık ise, *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyası üyeleri RNA'lerinin transkripsiyon, enzimatic kesim ve ligasyon adlı aşamalardan oluşan replikasyonlarında farklı enzimlerin ve bazı ribozimlerin görev almasıdır. Örneğin, çekirdekte sentezlenen DNA'ne bağımlı RNA polimeraz enzimi II (Pol II) PSTVd ve diğer *Pospiviroidae* familyası üyelerinin transkripsiyonu için elzemdir (16). Sirküler (+) polariteli PSTVd RNA'nde transkripsiyonun başladığı baz yakın zamanda molekül üzerindeki 359. urasil (U359) ya da 1. sitozin (C1) olarak tespit edilmiştir. Ancak, (-) polariteli RNA kalıbında transkripsiyonun başladığı yer henüz tespit edilememiştir. Viroid genomunun sol uç bölümdeki replikasyonu başlatma yerine ek olarak viroid RNAsı üzerindeki iki adet GS kutusunun da PSTVd'nin transkripsiyonunda rol aldığı belirlenmiştir. *Avsunviroidae* familyası üyelerinin kloroplastlarda gerçekleşen transkripsiyonlarında ise, iki polimeraz enzimi görev almaktadır. Nükleusta sentezlenen DNA'ne bağımlı RNA polimeraz enzimi (NEP) özellikle ASBVd ve PLMVd adlı viroidlerin transkripsiyonunda, plastidlerde sentezlediği DNA'ne bağımlı RNA polimeraz enzimi (PEP)'nin ise sadece PLMVd'nin transkripsiyonunda görev aldığı tespit edilmiştir. ASBVd'de transkripsiyonun başladığı yerin (+) ve (-) polariteli RNA ipliklerinde sırasıyla U121 ve U119 olduğu saptanmıştır (Şekil 3). PLMVd'nde (+) ve (-) polariteli RNA iplikleri için bu konum sırasıyla A50 ve C51 ile U248 olarak

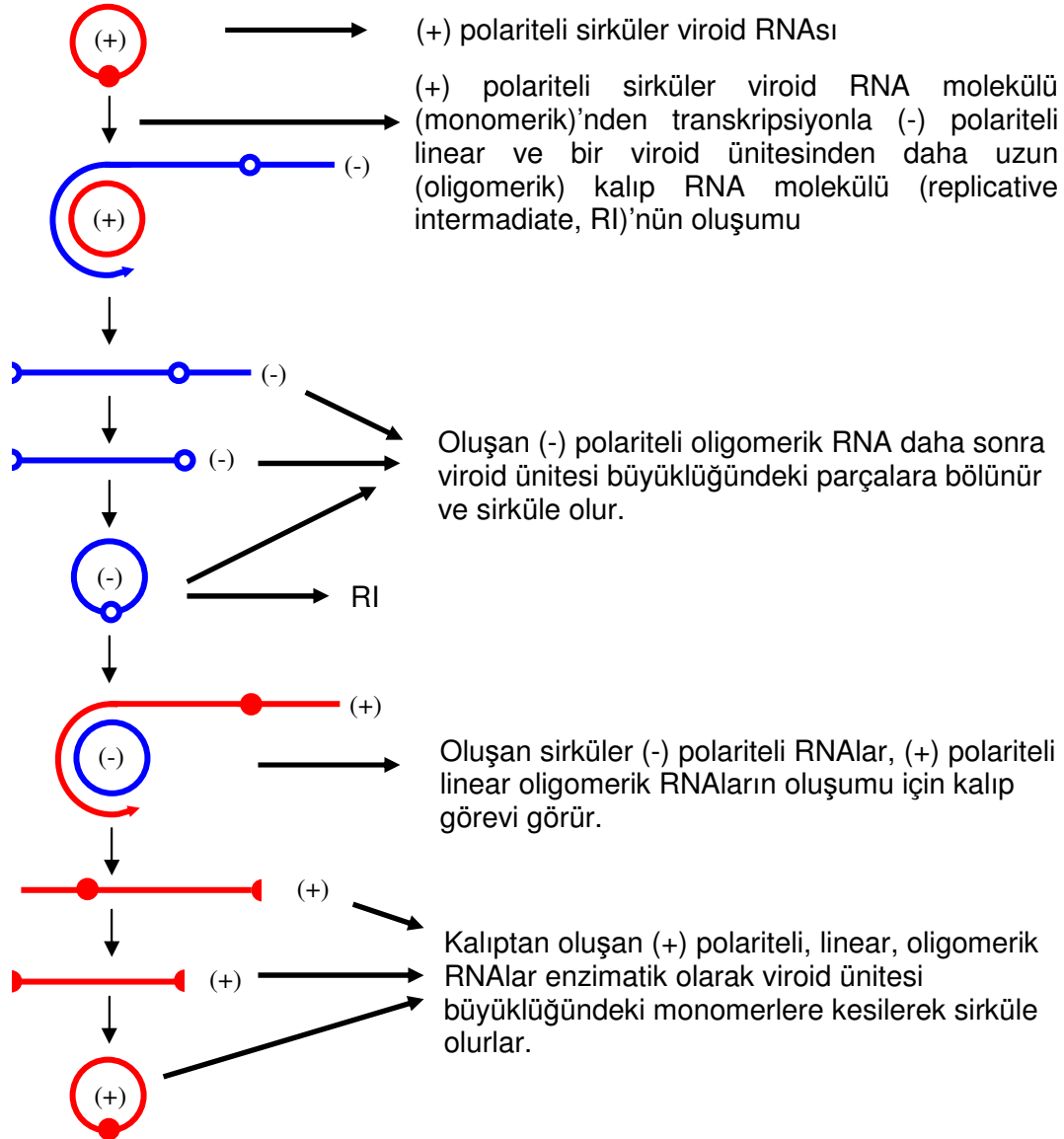
tespit edilmiştir. Bunlardan ilk ikisi viroidin ikincil yapısı üzerinde sol uç bölgede yer alan halka içerisinde, diğeri ise PLMVd'nin replikasyon esnasında kendi kendine kesim bölgesi (self-cleavage site)'ne yakın bir yer olan viroid molekülünün korunmuş bölgesinde yer almaktadır (17, 18).



Şekil 1. Yuvarlanan çember modelinde asimetric çoğalma şekli (*Pospiviroidae*)

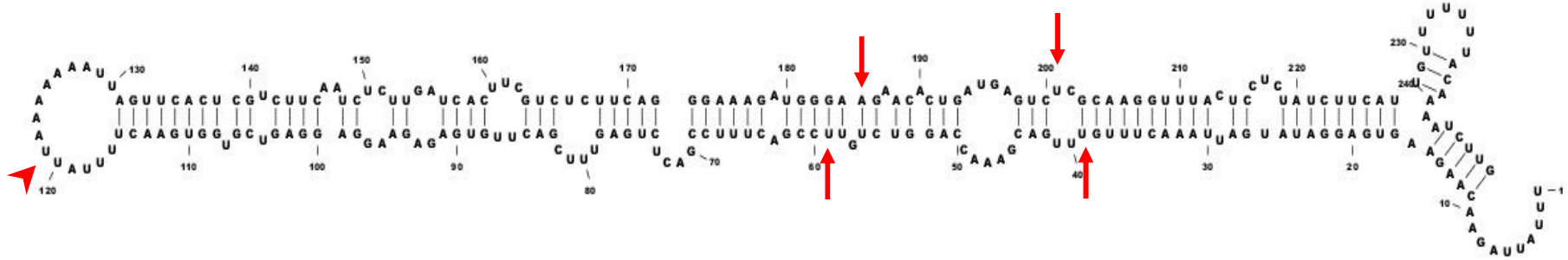
Pospiviroidae ve *Avsunviroidae* familyasındaki üyelerin replikasyon işlemlerindeki kesim ve birleşme (ligasyon) aşamalarında da farklı enzimler görev yapmaktadır. *Pospiviroidae* familyasında enzimatik kesimi bilinmeyen bir konukçu enziminin katalize ettiği bildirilmektedir. PSTVd'nin ilk enzimatik kesimi muhtemelen GNRA dördü halka yapısı (GNRA tetraloop: RNA'nın ikincil yapı oluşturan kollarının uçlarını birleştiren halka şeklindeki dördü baz yapısı, burada N: A, C, G yada U'dir; R ise A yada G'dir.) içerisinde yer alan G95 ve G96 pozisyonlarındaki nükleotidlerin arasında başlamaktadır. Daha sonra, GNRA halka yapısı E-halka motifine (loop E motif) dönüşmekte ve bu durum RNA'nın 5' ucunun stabilize olmasını sağlamaktadır. İkinci kesim ise bir viroid ünitesi büyüklüğündeki kalıp RNA molekülünü serbest bırakmaktadır. Oluşan RNA molekülünün 3' ucu karşılıklı iki baz içermektedir. Bununla beraber, aynı familyada yer alan (örneğin *Apple scar skin viroid*, ASSVd) ve bünyesinde GNRA dördü halka yapısı bulunmayan üyelerin bu şekilde kesim ve ligasyon mekanizmaları yoktur (19). Bu nedenle, Gas ve ark., (20) 1 nolu saç tokası formu (hairpin I) [merkezi korunmuş bölgenin (CCR) sol tarafında yer alan iki iplikli yapı] ile yanındaki nükleotidlerin *Pospiviroidae* familyası üyelerinin viroid ünitesi büyüklüğündeki moleküllere enzimatik olarak kesiminde görev aldıklarını saptamışlardır. *Pospiviroidae* familyası üyelerinin aksine *Avsunviroidae* familyası

üyeleri kesim için konukçu enzimlerine ihtiyaç duymamaktadırlar. Çünkü, bu familyadaki viroidler RNase aktivitesine sahip ribozimler gibi fonksiyon gösteren çekiç kafası biçimli (hammerhead) yapılar oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu yapılar hem (+) ve hem de (-) polariteli RNA molekülleri içerisinde mevcut olup *in vitro* ve *in vivo* olarak kendi kendine kesimi katalize edebilmektedirler. Ligasyon aşamaları ise günümüz itibarı ile netleşmiş değildir. Oluşan monomer viroid ünitelerinin dairesel biçime dönüşmesi (sirkülize olmaları) kendi kendine katalize olma yolu ile mi yoksa kloroplast orijinli bir RNA ligaz enzimi aracılığıyla mı olduğu bugün hala net değildir (21).

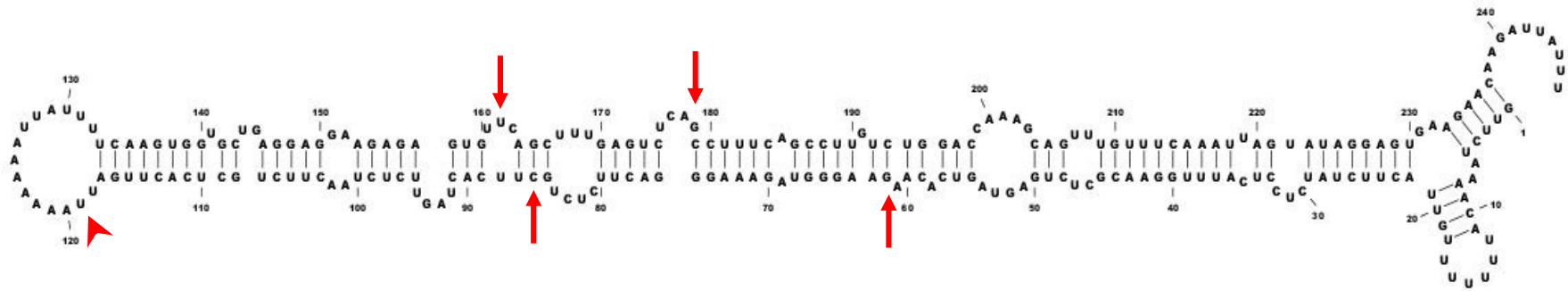


Şekil 2. Yuvarlanan çember modelinde simetrik çoğalma şekli (*Avsunviroidae*)

Pospiviroidae ve *Avsunviroidae* familyası üyelerinin RNA moleküllerinde sahip oldukları farklı korumuş RNA motiflerinin viroid replikasyonunda görev aldıkları bilinmektedir. *Pospiviroidae* familyası üyeleri için merkezi korunmuş bölge (CCR) viroidin replikasyonu için elzemdir.



a) (+) polariteli ASBVd (Gen Bankası Ulaşım No: J02020)



b) (-) polariteli ASBVd

Şekil 3. Monomerik sirküler (+) ve (-) polariteli ASBVd'nin ikincil yapısı. Çekiç başı formunda ribozim oluşturan sekans dizileri kırmızı oklar ile gösterilmiştir. Ribozimler içerisinde yar alan korunmuş bölgeler siyah renk ile gösterilmiştir. (+) ve (-) polariteli ipliklerde transkripsiyonun başladığı yerler (sırasıyla U121 ve U119) ok başları ile gösterilmiştir.

Buna karşın, *Avsunviroidae* familyasındaki üyelerin replikasyon işlemleri için çekiç kafası biçimli RNA moleküllerinin oluşumunu sağlayan küçük korunmuş RNA motifleri gereklidir. Bir viroidin replikasyon şeklini belirleyen kriterler arasında viroidin genom yapısı, katalitik aktivitesi ve konukçu hücre bileşenleri ile olan interaksyonu yer almaktadır (21-23).

Yuvarlanan Çember Modeli Replikasyon: Simetrik ve Asimetrik Çoğalma

Enfekteli bitki dokularında viroid replikasyonunu başlatan sirküler viroid RNA'leri ile oligomerik yapıdaki kalıp RNA'lerinin bir arada tespit edilmesi bu patojenlerin yuvarlanan çember modeline özgü mekanizma ile çoğaldıklarını desteklemektedir. En çok rastlanan enfeksiyöz (+) polariteli monomerik sirküler RNA molekülünün, konukçu hücredeki RNA'ne bağımlı RNA polimeraz enziminin yardımı ile oligomerik (-) polariteli RNA molekülüne transkripsiyonu gerçekleştirmektedir ve sonrasında ise (+) polariteli oligomerik RNA iplikleri sentezlenmektedir (24, 25, 26, 27). Bu ipliklerin uygun RNazlar ile enzimatik olarak kesilmesi ve hücre içindeki bir RNA ligaz enzimi ile de sirküle olması sonucu yuvarlanan çember mekanizmasının son ürünü olan (+) polariteli sirküler monomerik viroid molekülleri oluşmaktadır. Mekanizmada ilk RNA-RNA transkripsiyonunda oluşan oligomerik ipliklerin PSTVd ile enfekteli bitki dokularında tespit edilmesi, bunların ikinci RNA-RNA transkripsiyonu aşamasında kalıp görevini üstlendiğini göstermiştir. Bu gözlemlere dayanarak, PSTVd ve bağlı olduğu familyadaki diğer üyelerin yuvarlanan çember mekanizması içerisinde asimetrik yolla çoğaldığı ifade edilmektedir (Şekil 1). Diğer yandan, ASBVd ile enfekteli avokado, PLMVd ile enfekteli şeftali ve bu viroidlerin dahil olduğu familyadaki diğer viroidler ile enfekteli olan konukçuların dokularında monomerik (-) polariteli sirküler RNA moleküllerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular dikkate alınarak, *Avsunviroidae* familyası üyelerinin yuvarlanan çember modeli içerisinde alternatif bir yol olan simetrik yolla çoğaldığını göstermiştir (Şekil 2). Transkripsiyon, enzimatik kesim ve sirküle olma aşamalarından oluşan her iki çoğalmada görev alan enzimlerin konukçu tarafından kodlandığı yada alternatif olarak viroid genomunda yer alan ribozimlerce katalize edildiği bilinmektedir. Zira, oldukça küçük olan bu patojenlerin mesajcı RNA gibi bir fonksiyonları bulunmamaktadır (28, 29).

Viroid Moleküllerinin Oluşumu

Konukçu hücre içerisinde DNA'ne bağımlı üç değişik RNA polimeraz (I, II ve III) enzimi bulunduğundan, akla gelen ilk soru, bunlardan hangisinin PSTVd'nin de dahil olduğu *Pospiviroidae* familyası üyelerinin sentezinde rol aldığı konusudur. Bu durum fungal toksin α -amanitin'in kullanıldığı deney ile açıklığa kavuşturulmuştur (7, 15, 23).

Yürütülen *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların bulgularına göre; PSTVd, CEVd ve HSVd adlı viroidlerin replikasyonunda α -amanitin (tipik olarak RNA polimeraz II'yi engelleyen bir toksindir)'in düşük konsantrasyonlarının bile replikasyonu engellediği tespit edilmiştir. Bu bulgu temel alınarak, replikasyonda kalıp RNA molekülünün oluşumunda RNA polimeraz II benzeri bir enzimin etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı enzimin, her iki yönlü RNA-RNA transkripsiyonunu katalize ettiği de görülmüştür. Gerçek RNA polimeraz II enzimi kullanılarak yürütülen başka bir çalışmada (7, 30), α -amanitin'in yine (+) ve (-) polariteli PSTVd RNA moleküllerinin uzamasını engellediği tespit edilmiştir.

Aydınlatılması istenen ikinci konu ise, viroid ipliğinin transkripsiyonunun viroid molekülünün spesifik bir yerinde mi yoksa molekül üzerindeki rast gele bir yerde mi başladığına ilişkilidir. Patatesten elde edilen çekirdek ekstraktlarına (+) polariteli monomerik sirküler PSTVd'ne ait RNA eklenerek yürütülen *in vitro* laboratuvar çalışmalarında, PSTVd (-) polariteli ipliklerin transkripsiyonunun çubuk şeklindeki ikincil yapı üzerinde yer alan GS kutularının aşağısında bulunan 15. ve 16. nükleotidlerde başladığı tespit edilmiştir (31). Kloroplastlarda meydana gelen replikasyonla ilgili olarak ise, bu organelde en az iki farklı DNA'ne bağımlı RNA polimeraz enziminin olduğu belirlenmiştir. Bunlardan ilki *E. coli*'dekine benzer biçimde çok sayıda alt ünitelerden oluşan ve plastidlerde kodlanan polimeraz (PEP), diğeri ise T3, T7 ve SP6 faj RNA polimerazlarına benzeyen, tek ünitelerden oluşan ve çekirdekte kodlanan polimeraz (NEP)'dir. Bu durum, karakterizasyonu yapılan bu enzimlerden hangisinin viroid molekülünün uzamasını katalize ettiği sorusunu akla getirmektedir. Bu sorunun cevabı, ASBVd ile enfekteli olan bitkilerin kloroplastta oluşan transkripsiyonun, tıpkı α -amanitin'in incelenmesinde olduğu gibi, tagetitoxin'in etkisinin araştırılması ile bulunmuştur. PEP tagetitoxin'e duyarlı olduğundan inhibe edilmiş ve NEP'e ise engelleyici yönde bir etki göstermemiştir. Bu bulgulara dayanarak, ASBVd'nin transkripsiyonunda NEP benzeri bir enzimin görev aldığı tespit edilmiştir (7, 32, 33).

Oligomerik Viroid İpliklerinin Sirküler Monomerlere Dönüşmesi

Pospiviroidae familyası üyelerine ait oligomerik (+) polariteli RNA'lerin kesimi ve sonrasında viroidin sirkülasyonu ile sonuçlanan işlemlerde görev üstlenen RNA ligaz enziminin konukçu hücre tarafından kodlandığı kabul edilmektedir. Patates bitkisinden farklı protokollerin uygulanması ile elde edilen hücre çekirdeği ekstraktlarının oligomerik (+) polariteli PSTVd RNA'ni, enfeksiyöz monomerik sirküler formlara dönüştürdüğü tespit edilmiştir. İlginç bir biçimde, spesifik olmayan fungal RNase'in da PSTVd RNA'ni *in vitro* koşullarda enzimatik olarak kestiği ve ligasyonla sirküle ederek enfeksiyöz forma dönüştürdüğü görülmüştür (33, 34). Bu durum RNase'in tek başına her iki reaksiyonu katalize edip etmediğini, replikasyonun ikinci adım için bir RNA ligaz enzimine ihtiyaç duyulup duyulmadığı sorularını akla getirmektedir. Bu konuda son yıllarda yapılan bazı çalışmalar (35), PSTVd (+) polariteli ipliklerin oluşumunda enzimatik kesim ve ligasyonda iki farklı konukçu aktivitesinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak, tipik RNase enzimi etki ettiği molekülün sol ucunda 5'-hidroksil, sağ ucunda ise 2', 3'-halka fosfodiester yapısını oluşturmaktadır. Buğdaydaki RNA ligazın ise bu spesifik uçlara bağlanma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Gerçekte bu RNA ligaz *in vitro* olarak enfekteli bitkiden izole edilen linear monomerik PSTVd RNA'ni sirküle edebilmektedir. Enzimatik kesim reaksiyonunun özgüllüğü, bir başka deyişle viroid RNA'nin işlendiği yer, büyük olasılıkla oligomerik viroid RNA'nin moleküler yapısı ile ilişkilidir. Bu bağlamda PSTVd (+) ipliğinin kesimi ve ligasyonu RNA molekülü üzerindeki dörtlü halka yapının E halka yapısına dönüşmesi ile oluştuğu ileri sürülmüştür. Bununla beraber, diğer bazı araştırmalar (33, 36), CCR'in alt ipliğinde alternatif kesim bölgeleri olduğunu belirtmektedir.

Avsunviroidae familyasında ise enzimatik kesimi bizzat viroid RNA'nin kendisi katalize etmektedir (otokatalitik). Bu işlem, her iki polariteye sahip viroid RNA'lerinden oluşan çekiç başlı ribozimler tarafından yürütülmektedir. Ligasyonda çekiç başlı ribozimler klasik RNase enzimini oluşturmasının yanında, viroid RNA'nin uçlarında 5'-hidroksil ve 2', 3'-halka fosfodiester yapılarını da meydana getirmektedir. Bu da tıpkı

buğday RNA ligaz enziminin katalize ettiği reaksiyondaki gibi, hücredeki RNA ligaz enzimleri aracılığıyla replikasyonun bu adımı tamamlanmaktadır. Alternatif olarak yapılan çalışmalar (22), viroidin kendi kendine kesimle oluşan linear monomerik PLMVd RNA'nin yine *in vitro* olarak kendi kendine sirküle olduğunu, bu durum ise sadece kesimin değil, aynı zamanda ligasyonun da otokatalitik olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Kendi kendine olan ligasyon aynı zamanda PSTVd'nde görülmüştür (37). Bu bulgu, bu özelliğin *Avsunviroidae* familyası üyelerine özgün bir durum olmadığını göstermektedir.

Sonuç

Günümüzde viroidlerin nasıl çoğaldıkları ya da replike oldukları hakkında çok sayıda araştırma yürütüldüğü görülmektedir. Bu sayede, viroid replikasyonun genel hatları ortaya konulmuştur: RNA temelli yuvarlanan çember modelinde *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyalarındaki üyelerin sırası ile asimetric ve simetric yolla çoğaldıkları tespit edilmiştir. Hücre içerisinde viroidlerin çoğaldıkları yerlerin farklılık göstermesinin, içerdikleri enzimlerle ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır. Yeni viroid ipliklerinin oluşumu PSTVd ve ASBVd adlı viroidleri için sırasıyla çekirdek orijinli RNA Polimeraz II ile kloroplast orijinli NEP-benzeri RNA polimeraz enzimi aracılığıyla katalize edilmektedir.

Enzimatik kesim reaksiyonları ASBVd ve diğer *Avsunviroidae* familyası üyelerinde çekiç başlı ribozimlerin keşfedilmesini sağlamıştır. Bu keşif, bitki virolojisinin yanı sıra aynı zamanda moleküler biyolojide de dikkate alınan fonksiyonel ve evrimsel sonuçlar doğurmuştur. Bununla beraber, PSTVd ve bu viroidin yer aldığı *Pospiviroidae* familya üyelerinin replikasyonundaki enzimatik kesimlerin ve kesim yerlerinin daha net biçimde tespit edilmesi çözüm bekleyen durumlardır. Benzer durum, replikasyonun üçüncü adımı olan RNA ligasyonu için de geçerliliğini korumaktadır. Burada özellikle kendi kendine olan kesim veya kesimde konukçu enzimlerinin kullanımı konusundaki çelişkilerin giderilmesi gerekmektedir ve bu konunun çözümü viroid çoğalması açısından pek çok bilinmeyeni de aydınlığa kavuşturabilecektir (7, 33).

Kaynaklar

1. Diener, T. O. and Raymer, W.B., 1967. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, 158: 378-381.
2. Diener, T.O., 1971. Potato spindle tuber 'virus': a plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTVRNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*. *Virology*, 43: 75-89.
3. Góra-Sochacka, A., 2004. Viroids: Unusual Small Pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (3): 587-607
4. Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. and Diener, T.O., 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virology*, 143: 623-629.
5. Flores, R. and Pallas, V., 2006. Viroids. In: *Handbook of Plant Virology*, pp. 93-106. Edited by J.A. Khan and J. Dijkstra. Haworth Press, Inc., USA, XVIII+452 p.
6. Hammond, R.W. and Owens, R.A., 2006. Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. doi: 10.1094/APSnet Feature-2006-11068, 8 p.

7. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S., 2003. Viroids. Eds., CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 p.
8. Randles, J.W., 2003. Economic Impact of Viroid Diseases. In: Viroids, pp. 3-11. Edited by A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, CSIRO Publishing, Australia, XVI+370 p.
9. Agrios, G.N., 2005. Plant Pathology "Fifth Edition". Elsevier Academic Press, Burlington, USA, XXV+922 p.
10. Hanold, D. and Randles, J.W., 1991. Coconut cadang cadang disease and its viroid agent. *Plant Disease*, 75: 330.
11. Da Graca, J.V., Mason, T.E. and Antel, J.H., 1983. Effect of avocado sunblotch viroid on fruit yield. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 6: 86-87.
12. Desjardins, P.R., 1987. Avocado sunblotch. In: *The viroids*, pp. 229-313. Edited by T.O. Diener. Plenum Publishing Corporation, New York, USA, 344 p.
13. Yamamoto, H., Kagami, Y., Jurokawa, M., Mishimura, S., Ukawa, S. and Kubo, S., 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Pep. Res. Lab. Kirin Brewery Co. Ltd.*, 16: 49.
14. Verhoeven, J.Th.J., 2010. Identification and epidemiology of pospiviroids. Thesis Wageningen UR.
15. Navarro, J.A., Daròs, J.A., and Flores, R., 1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology*, 253: 77-85.
16. Mühlbach, H.P. and Sängler, H.L., 1979. Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature*, 278: 185-188.
17. Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K., Mors, M., Schmitz, M., Steger, G. and Riesner, D., 2006. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology*, 347: 392-404.
18. Baumstark, T. and Riesner, D., 1995. Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Research*, 23: 4246-4254.
19. Fels, A., Hu, K. and Riesner, D., 2001. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts predominantly at two specific sites. *Nucleic Acids Research*, 29: 4589-4597.
20. Gas M.E, Hernández, C., Flores, R. and Daròs, J.A., 2007. Processing of nuclear viroids in vivo: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathogens*, 3: 1813-1825.
21. Flores, R., Daròs, J.A. and Hernández, C., 2000. *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research*, 55: 271-323.
22. Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P. and Perrault, J.P., 1995. Intraand intermolecular non enzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology*, 212: 705-709.
23. Hutchins, C.J., Keese, P., Visvader, J.E., Rathjen, P.D., McInnes, J.L. and Symons, R.H., 1985. Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids. *Plant Mol. Biol.*, 4: 293-304.

24. Branch, A.D., and Robertson H.D., 1981. Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, pp. 6381-6385.
25. Branch, A.D. and Robertson, H.D., 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science*, 223: 450-455.
26. Owens, R.A. and Diener, T.O., 1982. RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, pp. 113-117.
27. Hadidi, A., Hashimoto, J. and Diener, T.O., 1982. Potato spindle tuber viroid - specific double-stranded RNA in extracts from infected leaves. *Ann. Virol.*, 133E: 15-31.
28. Daròs, J.A., Marcos, J.F., Hernández, C. and Flores, R., 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp. 12813-12817.
29. Bussièrre, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J. and Perreault, J.P.. 1999. Subcellular localization and the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virol.*, 73: 6353-6360.
30. Schindler, I.M. and Mühlbach, H.P., 1992. Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.*, 84: 221-229.
31. Riesner, D., Fels, A., Hu, K., Klümper, S., Schröder, A., Schrader, O., Dingley, A. and Grzesiek, S., 2000. Molecular viroid-host interactions involved in transcription, processing, and pathogenesis. *EMBO Workshop 'Plant Virus Invasion and Host Defense'*, Kolymbari, Greece, 11 p.
32. Navarro, J.A., Vera, A. and Flores, R., 2000. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology*, 268: 218-225.
33. Flores R, Daròs, J.A. and Navarro, J.A., 2003. Replication. In *Viroids* (eds. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. and Semancik, J.S.) CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp.55-60.
34. Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.P. and Sängner, H.L., 1987. Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs are accurately processed *in vitro* to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. *EMBO J.*, 6: 2173-2183.
35. Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. and Abelson, J., 1982. Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science*, 217: 1147-1149.
36. Hammond, R., Diener, T.O. and Owens, R.A., 1989. Infectivity of chimeric viroid transcripts reveals the presence of alternative processing sites in potato spindle tuber viroid. *Virology*, 170: 486-495.
37. Baumstark, T., Schröder, A.R.W. and Riesner, D., 1997. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, 16: 599-610.