

## Virüs Enfeksiyonları ile Mücadelede Gen Susturulması ve Uygulamaları

Kemal Değirmenci<sup>1</sup>, Filiz Ertunç<sup>2</sup>

### Özet

Doğada bulunan bitkiler, patojenlerden kaynaklanan hastalıklardan olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu patojenler funguslar, bakteriler, fitoplazmalar, parazit yüksek bitkiler, nematodlar, virüsler ve viroidlerdir. Bitkilerin ortak yaşam alanlarını paylaştıkları bu patojenlerden zarar görmemeleri çoğu zaman olanaksız bulunmaktadır. Doğada bazı bitkiler insanoğlunun herhangi bir müdahalesi olmadan bu enfeksiyonlara rağmen canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Bu tür örnekler bize bitkilerde patojenlere karşı doğal savunma mekanizmalarının bulunduğunu göstermektedir. Bu doğal savunma mekanizmaları; bitkilerin sahip oldukları fiziksel engeller, patojenlerin girişini engelleyen biyokimyasal reaksiyonlar, patojenin girişinden sonra bitkinin salgıladığı toksik bileşikler, enfeksiyondan sonra salgılanan bazı enzimlerin fonksiyonları ve kalıtsal dayanıklılık mekanizmaları şeklinde sıralanabilir. Bu dayanıklılık mekanizmaları bugün artık genetik kurallar ile açıklanmaktadır. Yapılan genetik çalışmalarda bitki patojeni virüsler tarafından enfekte edilmiş bitki hücresinde viral dsRNA çoğalmasının bu hücrede viral ssRNA'yı hedef alan siRNA /RNase kompleksinin oluşmasına sebep olduğu ortaya koyulmuştur. Bu tür çalışmalar sonucunda bitki patojeni virüslerin mücadelesinde gen susturulması mekanizmasının kullanılabileceği anlaşılmıştır.

### Giriş

Doğada bulunan bitkiler, patojenlerden kaynaklanan hastalıklardan olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu patojenler funguslar, bakteriler, fitoplazmalar, parazit yüksek bitkiler, nematodlar, virüsler ve viroidlerdir. Bitkiler 100.000 fungus, 2.500 parazit yüksek bitki, 1.000 virüs ve viroid, 500 prokaryotik tek hücreli parazit ile içinde buldukları ortamı paylaşmak ve hatta onlarla rakabet etmek zorundadırlar. Bitkilerin ortak yaşam alanlarını paylaştıkları bu patojenlerden zarar görmemeleri çoğu zaman olanaksız bulunmaktadır. Bir bitki türü çok sayıda patojen ile enfekte

---

<sup>1</sup> Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Yenimahalle, Ankara

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara

edilebildiği gibi, tek bir patojenle de enfekte edilebilmektedir (1). Doğada bazı bitkiler insanoğlunun herhangi bir müdahalesi olmadan bu enfeksiyonlara rağmen canlılıklarını devam ettirebilmektedir. Bu tür örnekler bize bitkilerde patojenlere karşı doğal savunma mekanizmalarının bulunduğunu göstermektedir. Bu doğal savunma mekanizmaları; bitkilerin sahip oldukları fiziksel engeller, patojenlerin girişini engelleyen biyokimyasal reaksiyonlar, patojenin girişinden sonra bitkinin salgıladığı toksik bileşikler, enfeksiyondan sonra salgılanan bazı enzimlerin fonksiyonları ve kalıtsal dayanıklılık mekanizmaları şeklinde sıralanabilir (2). Bu dayanıklılık mekanizmaları bugün artık genetik kurallar ile açıklanmaktadır. Yapılan genetik çalışmalarda bitki patojeni virüsler tarafından enfekte edilmiş bitki hücresinde viral dsRNA çoğalmasının bu hücrede viral ssRNA'yı hedef alan siRNA /RNase kompleksinin oluşmasına sebep olduğu ortaya koyulmuştur. Bu tür çalışmalar sonucunda bitki patojeni virüslerin mücadelesinde gen susturulması mekanizmasının kullanılabileceği anlaşılmıştır (3).

## **Bitki Patojeni Virüslerle Konvansiyonel Mücadele Yöntemleri**

Virüslerin morfolojik yapıları, enfeksiyon öncesi taşınma mekanizmaları, enfeksiyon mekanizmaları, bitki içerisinde çoğalma ve yayılma mekanizmalarının kendine has özellikler taşımasından dolayı bu patojenler ile kimyasal mücadele mümkün değildir. Virüsler ile kimyasal mücadele indirekt olarak vektörlere karşı yapılmaktadır. Ancak özellikle kültür bitkilerinde bu patojenlerin vektörlerine karşı kimyasal mücadele yapılmış olmasına rağmen virüs ve viroid hastalıklarının doğada şiddetli enfeksiyonlar gerçekleştirmeleri engellenememektedir. Bu durum özellikle kültür bitkilerinde sıkça görülmektedir. Bu da virüslerin ve viroidlerin vektörlerinin çok etkili ve dinamik olduklarını ve doğada taşınma yollarının çok etkili olduğunu göstermektedir. Bu tür örnekler bu patojenlerle mücadelede vektörlere karşı da yürütülen kimyasal mücadelenin yeterli olmadığını göstermektedir (1).

Virüs ve viroid hastalıklarına karşı mücadele yöntemlerinden bir tanesi de bu patojenlerden ari materyal üretilmesi ve yetiştiriciliğin bu materyaller ile yapılmasıdır. Gerek tek yıllık gerekse çok yıllık bitkilerde üretim materyalinin virüslerden ari olması virüsler ile mücadelede önemli bir aşamadır. Bu durum kültür bitkilerinde özellikle tek yıllık bitkilerde vejetasyon süresinde virüs enfeksiyonunu geciktirici bir etkiye sahiptir. Ancak dinamik ve etkili taşınma yollarına sahip olan virüslerin başlangıçta virüsten ari olan bu bitkileri vejetasyon süresince enfekte etmeleri kuvvetle muhtemeldir. Özellikle çok yıllık bitkilerde doğal enfeksiyonun olduğu durumlarda bu enfeksiyonun kaçınılmaz olduğu düşünülmektedir. Virüsten ari materyal üretimi de virüslere karşı mücadelede enfeksiyonu geciktirse de kesin bir çözüm değildir.

Virüslerle mücadelede eskiden beri uygulanan bir yöntem de çapraz koruma (cross protection) yöntemidir. Bu yöntem bir bitkide şiddetli enfeksiyon oluşturma özelliğine sahip bir virüs tarafından enfekte edilmeden önce o virüsün zayıf straininin bitkiye verilmesi ve bu sayede şiddetli strainin bitkiyi enfekte edememesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemin gerek tek yıllık bitkilerde gerekse çok yıllık bitkilerde başarılı uygulama örnekleri bulunmaktadır. Ancak her virüsün kendine has zayıf straininin bulunmaması, yöntemin mekanizmasındaki bazı riskler ve yöntemin uygulama zorluğu bulunmaktadır. Bu gibi dezavantajlar bu yöntemin de virüslerin mücadelesinde yeterli olmadığını göstermektedir (4).

Bitki virüsleri ile mücadelede en etkili yollardan bir tanesi virüs hastalıklarına karşı dayanıklı bitkilerin kullanılmasıdır. Dayanıklı bitkilerde, bitkinin bir enfeksiyonla karşılaşması durumunda patojen bitki ilişkisinin bitkinin lehine değişerek bitkinin bu enfeksiyona karşı koyabilmesi gerekmektedir. Dayanıklılık bitkinin doğal yapısında olabildiği gibi sonradan kazanılmış da olabilmektedir. Bitkilerde dayanıklılık sadece bitkinin genetik yapısına bağlı değildir. Bu durumda patojenin kalıtsal özellikleri de önemli rol oynamaktadır. Burada bitkideki dayanıklılığı, konukçu ile patojenin genetik özellikleri arasındaki interaksiyon belirlemektedir. Bitkide enfeksiyonun gelişmesinde ve enfeksiyon sonrası gelişmelerde bitkinin dokusal ve biyokimyasal yapısı önemlidir (1).

## **Bitki Patojeni Virüslerde Gen Susturulması**

Son yıllarda virüs hastalıklarına karşı kullanılan savunma mekanizmalarından birisi de gen susturulmasıdır. Gen susturulması bitkilerin yapısında bulunan bitki hücrelerine giren herhangi bir yabancı gene karşı geliştirdikleri doğal bir savunma mekanizmasıdır. ssRNA veya dsRNA'ların dicer ile kesilmesi sonucu oluşan 18 -25 nükleotid uzunluğunda kotlama yapma kabiliyeti olmayan ve henüz fonksiyonları tam olarak bilinmeyen dsRNA yapısındaki küçük RNA'ların rol oynadığı bu mekanizmaya genel anlama gen susturulması adı verilmektedir. Gen susturulması gen aktivasyonunu değiştirmek veya azaltmak amacıyla kullanılan bir tekniktir. Bu teknik insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve böceklerde genlerin keşfi ve fonksiyonlarının tanımlanması için kullanılmaktadır (5). Gen susturulmasının bitkilerde genlerin yapısına ve çeşitliliğine bağlı olarak çok farklı tiplerinin olduğu görülmüştür. Fakat Benzer genlere bağlı gen susturulması (homolog-depent gene silencing – HPGS)'nin genel olarak iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki transkripsiyon aşamasındaki gen susturulması (transkripsiyon silencing - TGS), ikincisi ise transkripsiyon sonrası gen susturulması (post-transcriptional gene silencing – PTGS) olarak adlandırılmıştır. Bunlara ek olarak gen sessizleşmesinin bir diğer mekanizması da DNA metilasyonu olayıdır. DNA'nın metilasyonu gen anlatımını kontrol eden hücresel bir epigenetik programdır. Bu mekanizma ilk defa transgenik bitkilerde viroid cDNA'sında tespit edilmiştir.

## **Gen Susturulmasının Tarihçesi**

1928 yılında *Tobacco ring spot virus* ile enfekte edilen tütün bitkilerinde dayanıklılıklar tespit edilmiştir. Bu çalışmadan sonra virüs enfeksiyonlarında buna benzer örnekler birçok çalışmada tanımlanmıştır. Ancak bu çalışmalar o yıllarda gen susturulması olarak tespit edilememiştir. Fakat bu ve benzeri çalışmalar daha sonraki yıllarda gen susturulmasının tipik açıklaması olarak varsayılmışlardır. Gen susturulmasında sistemik çalışmalar transgenik bitkilerin elde edilmesi ile birlikte başlamıştır (6). 1990 yılında bu mekanizma daha koyu renkte petunya çiçeği elde edilmeye çalışılırken beyaz-mor alacalı renkte çiçeklerin elde edilmesi ile fark edilmiştir. Bu çalışmada kalkon sentezleyen genlerin teşvik edilmesi ile daha koyu mor renkli petunyalarda elde edilmeye çalışılmıştır. Ancak kalkon sentezleyen iç genlerin susturulması neticesinde beyaz ve değişik renkliliğin olduğu görülmüştür. 1992'de Dougherty ve arkadaşları; tütün bitki genomlarında aktarılamayan potyvirus

frangmentlerinin bitkide virüse karşı dayanıklılık oluşturmanın yanında, viral RNA'nın deგრatasyonu ile ilişkili olduklarını tespit etmiştir. Bu tespitten birkaç yıl sonra gen susturulmasında RNA deग्रatasyonunun spesifik kısa dsRNA'ların birikmesine yol açtığı tespit edilmiştir. Bu spesifik kısa dsRNA'lar şimdi kısa interferin RNA (siRNA) olarak bilinmektedir. Bu bulgular bitkilerde gen susturulmasında sistemik çalışmaların başlamasını teşvik etmiştir (7). 1995 yılında yapılan çalışmalarda *C.elegans*'larda sense RNA'nın gen susturulmasını teşvik ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda gen susturulması asRNA kullanarak sağlamaya çalışılmış ancak, bir kontrol olarak sense RNA kullanıldığı zaman susturmanın sağlandığı görülmüştür. 1998 yılında Fire ve arkadaşları *C.elegans*'lar ile yaptıkları çalışmada asRNA'nın gen susturulmasını teşvik etmesine rağmen dsRNA'nın daha etkili olduklarını tespit etmişlerdir. Bu tespit ile birlikte RNAi terimini bu sürece dahil etmişlerdir. 1998 yılına kadar değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda; transgenler ve içgenler ile virüsler arasında benzer sekanslar üzerinde yapılan çalışmalardan virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması (Virus induce gene silencing – VIGS) sistemi geliştirilmiştir. Ve bu sistemin Transkripsiyon sonrası gen susturulması (Post Transcriptional Gene Silencing - PTGS) mekanizmasına sebep olduğu tespit edilmiştir. PTGS'lerin moleküler mekanizmaları üzerine ilk bulgular 1999 yılında Hamilton ve Baulcombe tarafından bitkilerde yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Bu çalışmalarda 18-25 nt'lik siRNA'ların gen susturulmasını teşvik ettikleri belirlenmiştir. 2000 yılında yapılan çalışmalarda eukaryotik türlerinde yaygın olarak bulunan gen susturulmasının değişik tipleri olan yardımcı baskılama (co-suppression), RNAi, quelling ve VIGS'in mekanizmalarının birbirine benzediğini ortaya koyulmuştur. Bütün bu çalışmalara ilave olarak gen susturulmasına gerçek vurgu Andrew Z. Fire tarafından 2006 yılında yapılmıştır. Bu bilim adamı *Caenorhabditis elegans* nematod'larında RNA interferansları keşfederek gen sessizleştirilmesinin mekanizmasına dikkatleri çekmiş ve Nobel ödülüne layık görülmüştür (8, 9).

## **Bitki Patojeni Virüslerde Gen Susturulmasının Mekanizmaları**

Gen susturulmasının esası sitoplazma ile çekirdek arasında ve bazen de uzak mesafelerde ki hücreler arasında mobil susturma sinyallerinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu mobil sinyaller kısa RNA (si-RNA, miRNA ve ta-siRNA)'lar tarafından oluşturulmaktadır. Gen susturulmasının birçok tipi bu sisteme dayanmaktadır. Gen susturulmasının bu mekanizmalarının anlaşılması için birçok makale ve çalışma yapılmıştır. Gen susturulmasının bir veya birkaç tipi tarafından kontrol edilen maddeler mobil genetik elementler, virüslerden kaynaklanan elementler veya bitkide olması gereken yerde olmayan doğal olarak rastlanan nükleik asitler olabilmektedir. Gen susturulmasının bitkilerde bitki patojen virüslerine karşı en çok uygulanan tipi Benzer Bağlı Genlerin Susturulması (Homolog - Depent Gene Silencing - HPGS) mekanizmasıdır. Bu mekanizma içerisinde bitkilerde oldukça yaygın olarak görülen gen susturulması mekanizmaları ise Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması (Post-Transcriptional Gene Silencing – PTGS) ve Transkripsiyon Sırasında Gen Susturulması (Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması – TGS) mekanizmalarıdır. PTGS ve TGS'ler bitki veya bitki viral kromosomu içerisine entegre olmuş nükleik asit girişi ile ilişkilidirler. TGS'lerin mekanizması hücre çekirdeğinde mRNA'nın translasyonunun miRNA ve onun tamamlayıcı çifti tarafından baskılanması esasına dayanmaktadır. Bu interaksiyon hedef mRNA'nın deग्रede olmasına veya doğrudan translasyonunun bloke olmasına neden olur. PTGS mekanizmasında ise genler

kopyalanmakta fakat kopyalanan genler degradesi olmaktadır. Benzer iç genlerin varlığında da transgenler PTGS'ye maruz kalabilmektedir. Bu tespit bize transgenlerin kendi kendilerine PTGS mekanizmasını aktive edebilmekte olduklarını göstermektedir. Son yıllarda üzerinde durulan bu mekanizmalar PTGS'nin temel mekanizmasını oluşturmaktadır. PTGS benzeri mekanizmaların tür sınırlaması olmaksızın birçok bitkide görülmesi, PTGS'nin temel RNA bozulmasının bir sonucu olduğunun bir ispatıdır. PTGS'ler genomlarda transgenik entegrasyonlar ile bağlantılıdır. Tipik transformasyonlarda değişebilen miktarlardaki transformatlar yardımcı baskılayıcı (co-suppression) etki göstermektedirler. Transgenlerin yardımcı baskılayıcı (co-suppression) için fonksiyonel protein kopyalayamamaları da PTGS'nin DNA ve RNA'nın temel bir fonksiyonu olduğunu gösteren bir başka kanıttır. Gen susturulmasının bitkilerde en az üç mekanizması bulunmaktadır. Bunlar sitoplazmik RNA susturulması (PTGS), içgen mRNA susturulması (TGS) ve DNA metilasyonu ile transkripsiyonel baskılamadır (7).

### **Sitoplazmik RNA Susturulması (PTGS)**

Bu mekanizma sitoplazmada benzer içgen RNA'ları ve transgen RNA'ları hedef almaktadır. PTGS transgenlerin kopyalanmasının devamı ile ilişkilendirilmektedir. PTGS mekanizması sitoplazmada RNA virüsleri tarafından tetiklenebilmektedir. Bu mekanizma genellikle transgenik ve virüs enfekteli bitkilerde siRNA ürünü tarafından yürütülmektedir. Bu gen susturma mekanizması bitki viral RNA susturulmasının en yaygını ve en iyi bilinenidir. Viral genomik RNA ile enfekteli bitki hücresi RNA bağlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi üretmektedir. Bu RdRp enzimi bir kalıp RNA kullanarak dsRNA'yı sentezlemektedir. Bu RNA dicer olarak bilinen RNase III enziminin üretimi için substrate sağlamaktadır. Dicer enzimi ise dsRNA ile kontak kurarak dsRNA'yı 18 - 25 nt'lik küçük parçalara ayırmaktadır. Bir adım sonrasında oluşan siRNA'nın rehber olarak adlandırılan iplikçiklerinden biri tamamlayıcı olarak RISC (RNA Induce Silencing Complex) ile birleşmektedir. siRNA'nın diğer iplikçığı RISC'den ayrılır ve degradesi olur. RISC'in bir bileşeni de özel Argonaut (Ago) proteindir. Özel protein Argonaut sadece RISC'in protein parçasını oluşturan bir proteindir. Bu proteinler bitkilerin doğal yapısında mevcut bulunmaktadır. Daha sonra RISC hedef viral RNA ile interaksiyona girer. Ago proteini RISC ile birlikte interaksiyona girdiği hedef viral ssRNA'yı keser. RISC ile siRNA komponenti parçalanan hedef RNA'ya yapışır. Bu durumda viral RNA'nın yapısı değişir. Yeni oluşan RNA'nın protein sentez dizisi tamamen değişir ve hedef RNA susturulmuş olur. Bu şekilde mekanizma tamamlanmakta ve hedef viral RNA işlevini kaybetmektedir.

Böylece hücrede viral ssRNA'dan sentezlenen dsRNA birikmesi engellenmiş olur. Bu mekanizmada siRNA'nın ana kaynağı RdRp enzimi tarafından sentezlenen viral dsRNA'lardır. Ancak hücrede üretilen siRNA'ların sadece %20'sinin viral dsRNA kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. siRNA'ların geriye kalan %80'i viral genomik tek sarmal RNA'dan üretilmektedir. Bitkilerde PTGS'nin öngörülen değişik mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar; Virüsler Tarafından Teşvik Edilen Gen Susturulması (VIGS), Viral Transgenler Tarafından Teşvik Edilen RNA Susturulması, Viral Olmayan Transgenler Tarafından Teşvik Edilen RNA Susturulması ve Doğal RNA İyileşmesinin Oluşması gibi mekanizmalardır (10-12).

## **miRNA Trafından Gerçekleştirilen İgen mRNA Susturulması (TGS)**

TGS mekanizması PTGS mekanizmasının aynısıdır. Bitkiler çekirdekte replike olan DNA virüslerinden *Cauliflower mosaic virüs* gibi bir virüs ile enfekte olduklarında bu virüsdeki 35S promotoru transgenlerin TGS mekanizmasını tetiklemektedir. Bu durumda transgenlerin PTGS mekanizması RNA içeren 35S RNA sekansları tarafından tetiklenir. Benzer durum bitkiye entegre edilmiş transgenlerin promotor sekanslarını içeren RNA virüsleri içinde geçerlidir. Ancak transgen durumunun söz konusu olmadığı durumlarda RNA virüslerinde RNA sitoplazmada replike olduğundan DNA metilasyonunun veya TGS'nin başlaması için çekirdeğe giriş yapılmalıdır. TGS'ler çekirdekte susturulmuş genlerin kopyalanmasının azaltılması ile tanımlanmaktadır ve etkilenmiş lotusların promotor bölgelerinin metillenmesi ile ilişkilidir. Bu mekanizmada hücredeki mRNA'nın translasyonu miRNA ve onun tamamlayıcı çifti tarafından baskılanmaktadır. Bu interaksiyon hedef mRNA'nın degradasyonunu teşvik eder veya doğrudan translasyonunu bloke eder. Hücrede miRNA'lar 120-150 nt'lik translasyonu yapılamayan kopyalardan üretilmektedir. miRNA'larda siRNA'lar gibi 18 - 25 nt'lik olarak dicer enzimi tarafından üretilen dsRNA'lardır. miRNA'lar ilk olarak *C.elegans*'larda tanımlanmıştır (13).

## **DNA Metilasyonu ve Kopyalanmanın Baskılanması**

Bu mekanizma ilk olarak viroid cDNA'sını bulunduran transgenik bitkilerde tespit edilmiştir. Transgenik bitkilerde yükseltilmiş kopyalama viroid cDNA'sının metilasyonunu tetiklemektedir. cDNA'nın metilasyonu ve promotorların kopyalanması özel siRNA'ların ve değiştirilmiş histonların gerekliliğini göstermektedir. Bu durum kromatin aşamasındaki gen susturulmasının hücre genomlarını transposanlara karşı koruduğunu düşündürmektedir (14).

## **Bitkilerde Antiviral Savunma Mekanizması Olarak PTGS Uygulamaları**

### **Virüsler Trafından Teşvik Edilen Gen Susturulması (VIGS)**

Virüsler tarafından Teşvik Edilen Gen Susturulması (VIGS) son yıllarda bitki genlerinin fonksiyonlarının tanımlanmasında kullanılan bir mekanizmadır. Bu mekanizma infekteli konukçu genlerinin sekanslarını taşıyan rekombinant virüs vektörlerinin tanımlanması ile birlikte ifade edilmeye başlanmıştır VIGS diğer metotlar ile karşılaştırıldığında basit uygulaması, hızı ve sonuç vermesi ile bitki transformasyonunda uygun bir metottur.

Bu yüzden VIGS *Nicotiana benthamiana*, *arabidopsis*, *tomato*, *barley*, *legume*, *cassava* ve diğer bitkilerde olmak üzere geniş bir bitki dizisinde kullanılan bir mekanizmadır (9, 15-19). Moleküler biyolojinin ve biyokimyanın gelişmesi ile VIGS'in mekanizmasının anlaşılması daha kolaylaşmıştır. Değişik bitki türlerine ve yeni enfeksiyon metotlarına uygun yeni VIGS vektörleri geliştirilmiştir. Enfeksiyon uygulamaları farklı bitki organlarında denenmiştir (20).

## VIGS'in Mekanizması

VIGS mekanizmasının esası benzer nükleer genlerin ve viral kopyalanmanın degrades olmasını sağlayan virüs enfeksiyonu tarafından teşvik edilen RNA susturulması sürecidir. VIGS bitkilerde PTGS, funguslarda quelling ve hayvanlarda RNA interferans olarak bilinen bir RNA susturulması mekanizmasıdır. VIGS'in mekanizması üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; gen susturulmasının teşvik edilmesi, susturma sinyalinin oluşturulması ve gen susturulmasının yayılması aşamalarıdır. Birinci aşamada dsRNA'lar gen susturulmasını ana faktörüdür. dsRNA'lar RdRp enzimi tarafından viral enfeksiyon sonucu hücreye giren viral ssRNA dan sentezlenmektedir. Sonra bu dsRNA'lar Dicer benzeri (DCL) enzimler tarafından tanınır ve 18 - 25 nt lik küçük RNA (siRNA)'lara bölünmektedir. dsRNA formasyonları farklı virüslerde değişiklik göstermektedir. RNA virüslerinde dsRNA direk viral ssRNA'dan RdRp enzimi tarafından sentezlenmektedir. Ancak DNA virüslerinden ds RNA indirek yollardan bilinmeyen bir mekanizma ile sağlanmaktadır. İki parçalı ssDNA yapısına sahip olan geminivirüsler dsRNA formu için bu yolu kullanmaktadır.

Bu sentez sırasında bu gibi DNA yapılı virüsler RdRp6, putative RNA helicase (SDE3), Argonaute1 (Ago1) ve SGS3 enzimlerine gereksinim duymaktadır. İkinci aşamada; gen susturulması sinyal serisinin çoğaltımı yapılmaktadır. Viral ssRNA'lar bir kalıp olarak kullanılır ve elde edilen siRNA'ların antisens kolları RdRp tarafından yeni dsRNA'ların sentezlenmesinde kullanılır. Yeni dsRNA'lar, daha çok siRNA'nın üretimi için tekrar harekete geçer ve süreç bu şekilde tekrarlanarak devam eder. Bu süreçte binlerce siRNA üretilir. RISC ile birleşen çift iplikçikli siRNA'nın antisens kolu, RISC'in hedef RNA ile birleşmesinde tamamlama bölgesinde bir alanda hedef RNA'nın kesilmesine yardımcı olur. Bu döngü devam ettirilerek hedef RNA'nın degradasyonu bitkinin her tarafına yayılmaktadır (20).

## VIGS'in Vektörleri

VIGS vektörü olarak ilk kez phytoene desaturaz geninin fragmentlerini taşıyan *Tobacco mosaic virus* (TMV) aynı genin tütün bitkilerinde susturulması için *N. Benthamiana* bitkilerinin enfeksiyonlarında kullanılmıştır. Bu uygulamadan sonra değişik bitkilerde VIGS'in uygulanmasında bir çok virüs vektör olarak geliştirilmiş ve uygulanmıştır. VIGS mekanizmasında kullanılacak uygun vektörün seçilmesinde; vektörün konukçu dizilişine, susturmanın etkinliğine, vektörün güvenilirlik özelliğine ve diğer faktörlere dikkat edilmelidir. VIGS uygulanmasında uygun vektörün seçilmesi çok önemlidir. *N. Benthamiana* ile VIGS çalışmalarının ilk dönemlerinde TMV ve PVX'in bir VIGS vektörü olarak uygunluğunun, tekrarlanabilirliğinin, etkinliğinin ve kalıcılığının yeterli olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra VIGS için iyi bir vektör olarak *Tobacco rattle virus* (TRV) geliştirilmiştir. TRV birden çok genom komponentlerine sahip ve çok sayıda bitkiyi enfekte edebilme özelliğinden dolayı iyi bir vektör olarak tanımlanmıştır. Geliştirilen pYL156 ve pYL279 TRV vektörleri birçok içgenin susturulmasında başarılı sonuçlar vermiştir. Dikotiledon bitkilerde TRV vektörleri en çok tercih edilen vektörlerdir (9, 21). Monokotiledon bitkilerde de *Barley stripe mosaic virus* ve *Brome mosaic virus* vektör olarak geliştirilen virüslerdir. Geleceği parlak olarak görülen bir başka vektörde TMV'nin U2 straininin satellit RNA'sından geliştirilen vektördür. VIGS vektörü olarak DNA virüslerinden geminivirüsler de kullanılmaya başlanmıştır. *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) ve *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV)'leri de PDS ve Chlorata 42 (CH42) genlerinin susturulmasında kullanılmaktadır.

İlave olarak Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) ile ilişkili stallite ssDNA –  $\beta$  (singel strand DNA-  $\beta$ ) *N. Benthamiana* bitkilerinde PDS, green floresan protein genleri (GFP) ve proliferating cell nuclear antigen genlerinin (PCNA) susturulmasında kullanılan yeni vektörler olarak bildirilmiştir. *Poplar mosaic virus* (PMV) odunsu bitkilerde, *Pea early browning virus* (PEBV) bakliyatlarda, *African cassava mosaic virus* (ACMV) manyoklarda VIGS vektörü olarak kullanılan diğer virüsler olarak belirlenmiştir.

VIGS çalışmalarında bitkinin enfekte edilmiş bölümleri, viral vektörün etkinliği ve susturmayı engelleyen ajanlar birlikte göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin PVX meristem dokusunu enfekte edememektedir, çünkü bu vektör henüz gelişmekte olan dokularda gen fonksiyonlarını tanımlamada uygun değildir. Ancak TRV vektörü meristemdeki susturulma sinyallerine ulaşabilmekte ve yönlendirebilmektedir. Yüksek etkili bir vektör sahip olduğu iki gen sekansının insörtü ile aynı anda iki geni susturabilmektedir. VIGS mekanizmasında TGMV ve CaLCuV virüs vektörlerinin ikili vektör olarak kullanılabildiği belirtilmiştir (21, 20).

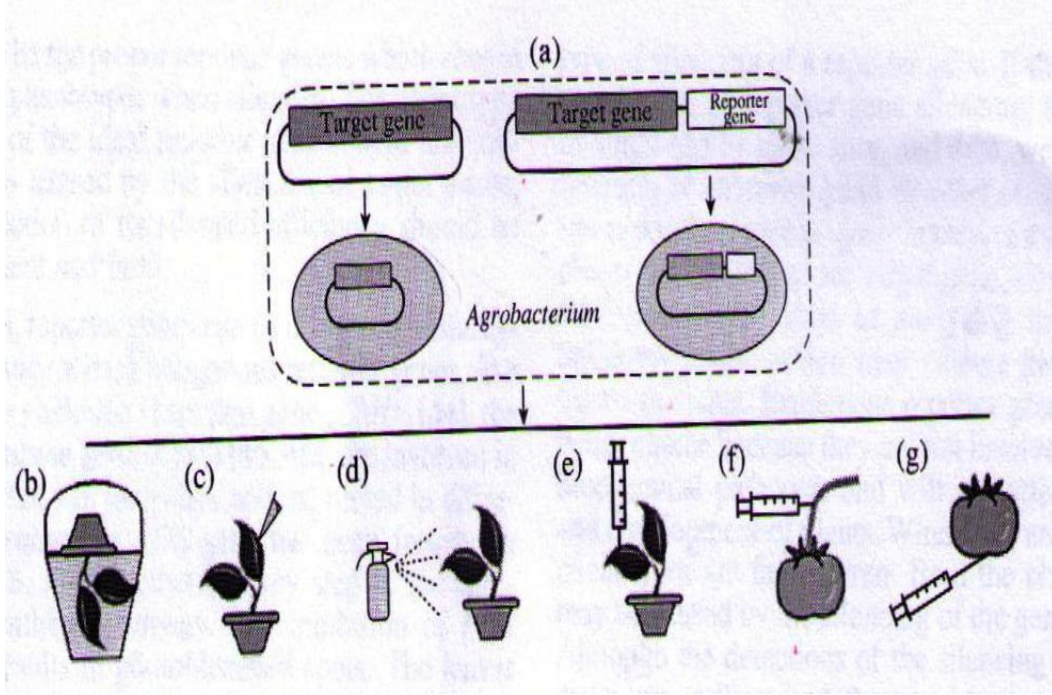
### **VIGS'in Metodolojisi**

Bitkilerde bu mekanizmanın işlemesi için öncelikle susturulacak genin belirlenmesi gerekmektedir. Bitkilerde iç gen susturulmasının tetiklenmesi için ilgili genin fragmentlerinin VIGS vektörüne aktarılması gerekmektedir. Sonra recombinant vektör *Agrobacterium*'a transfer edilmektedir. Daha sonra bitkiler recombinant VIGS vektörlerini taşıyan *Agrobacterium* ile inokule edilirler. İnokulasyondan birkaç hafta sonra bitkilerde hedef genlerin susturulduğu görülmektedir. Bu çalışmada uygulamanın her aşamasında yüksek susturma etkisinin korunması için bazı faktörler göz önünde bulundurulmalı ve optimizasyon yapılmalıdır.

Benzer genlerin boyutlarının büyüklüğü VIGS'in etkinliğini etkilemektedir. İç genlerin etkili susturulmasının sağlanması için 300-800 bp en uygun büyüklüktür. Eğer boyut 1.5 kb'i geçerse virüs yayılamaz ve büyük oranda insörtünü kaybeder. Etkili susturma için en düşük boyut ise 23 bp olarak belirlenmiştir. VIGS uygulamalarında dikkat edilmesi gereken faktörlerden bir tanesi de susturmak için hedeflenen genin bölgesidir. VIGS çalışmalarında recombinant vektör yapılandırılarak, *Agrobacterium*'a transfer edilmektedir.

Daha sonra enfeksiyon metodu seçilmektedir. Enfeksiyon için birçok metot kullanılmaktadır. İlk kullanılan metotlar kürdan kullanımı ve microprojectile bombardıman metotlarıdır. Son zamanlarda vakum infiltrasyon, şırıngalama ve sprey metotları kullanılmaktadır. Son zamanlarda bitkilerin özel organlarına enfeksiyon yaklaşımı geliştirilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda domates meyve dokularına, meyve sapına enfeksiyonlar uygulanmıştır. Gen susturulmasının etkisini çevre şartları etkileyebilmektedir. Çevre şartları bitkinin gelişimini etkilediği gibi virüsün bitkide yayılmasını da etkilemektedir. Sıcaklık susturmanın etkinliği için en önemli faktörlerden bir tanesidir. Virüsler ile enfekteli bitkilerde genellikle yüksek sıcaklıklar simptom azalmasına sebep olmaktadır. Genellikle TRV ile enfekteli domates bitkilerinde VIGS'in 15-21 derecelerde etkili olduğu saptanmıştır (22, 23, 3).





Şekil 3 VIGS'in bitkilere uygulanma şekilleri

### Viral Transgenler Tarafından Teşvik Edilen RNA Susturulması

Bu mekanizma PTGS'nin oluşmasını sağlayan mekanizmalardan bir tanesidir. Bu mekanizmada PTGS'nin viral transgenler tarafından teşvik edildiği düşünülmektedir. Transgenik bitkilerde bitki virüs genomunun bir bölgesinin ifade edilmesi sonucu bitkilerde virüslere karşı dayanıklılığın olduğu ifade edilmektedir. Dayanıklılığın birçok durumunda viral transgenik proteinlerin ifadesine gerek duyulmadan transgen viral RNA tarafından dayanıklılık sağlanmaktadır. Viral seküensleri içeren transgenlerin transgenik bitkilerde yüksek seviyede bulunması ile PTGS aktive edilmektedir. Bu durumun sonucunda dayanıklı fenotipler oluşmaktadır. Bu viral transgenler tarafından teşvik edilen PTGS özel viral hedef RNA'sının hızlı bir şekilde bozulmasına neden olur (8, 24, 6).

### Viral Olmayan Transgenler Tarafından Teşvik Edilen RNA Susturulması

Viral transgenler tarafından teşvik edilen gen susturulmasına benzer bir mekanizma eğer virüs transgenler ile benzer geni taşıyorsa viral olmayan transgenler tarafından da sağlanabilmektedir. Örneğin beta – glucuronidase (GUS) kodlayan raportör gen için post transcriptional olarak susturulmuş olan bir transgenik tütün bitkisinde aynı GUS geni taşıyan PVX vektörünün enfeksiyonuna karşı dayanıklılık tespit edilmiştir. Bu tip viral dayanıklılıklar PTGS ile susturulmuş transgenik bitkilerde virüs sekansları ile benzer genlerin olması durumunda her zaman oluşmaktadır. Transgenler tarafından teşvik edilen bu tip PTGS'lerde viral RNA açıkça hedef olarak belirlenmektedir (25).

## Doğal RNA İyileşmesinin Oluşması

Bu tip PTGS, transgenik olmayan bitkilerin belirli bir RNA veya DNA virüsleri ile enfeksiyonu tarafından teşvik edilmektedir. Bu durum PTGS'nin bitkilerde virüs enfeksiyonlarına karşı doğal bir savunma mekanizması olduğunun bir kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bu mekanizma VIGS'in mekanizması ile benzerdir. Bu durumdaki bir PTGS ancak bitki genomu ve teşvik edici virüs arasında herhangi bir benzerlik olmadığı durumlarda görülmektedir. Burada VIGS'de olduğu gibi bitki genomu ile virüs arasında herhangi bir benzerlik yoktur. Viral RNA sadece hedef olarak seçilmiştir (26, 27).

## PTGS Mekanizmasının Bazı Elemanları ve Fonksiyonları

### Dicer

Dicer enzimi ilk olarak *Drosophila* hücrelerinde tanımlanmıştır (28). Bu enzime benzer bitki enzimleri Dicer benzeri enzimler (DCL) olarak bilinmektedir. Dicer geni insan hücrelerinde, fare hücrelerinde ve nematod hücrelerinde bir kopyada bulunmaktadır. Böcek (*Drosophila melanogaster*) ve fungus hücrelerinde ise iki kopyada bulunmaktadır. DCL geni bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. *Arabidopsis thaliana* genomlarında dört adet, *Populus trichocarpa* genomlarında beş adet ve *Oryza sativa* genomlarında altı adet DCL geni bulunmaktadır (29). DCL enzimlerinin fonksiyonları *A. thaliana*'da tanımlanmıştır. Bütün DCL enzimleri dört tipte sınıflandırılmıştır. DCL1 miRNA biogenesislerin üretiminde kullanılmaktadır. DCL2 viral dsRNA'lardan siRNA üretiminde kullanılmaktadır. DCL3 kromatinlerin modifikasyonunda kullanılmaktadır. DCL4 ise trans-acting siRNA (ta-siRNA) üretiminde rol oynamaktadır. DCL1, DCL2, DCL3 ve DCL4 genleri genomda tek kopya olarak bulunmaktadır.

Çizelge 1 DCL enzimlerinin fonksiyonları (yeniden oluştur)

DCL1	RNase III, dsRNA-binding, chelicase with the DEAD box, PAZ, DUF283	miRNA synthesis	miRNA, siRNA
DCL2	RNase III, dsRNA-binding	Synthesis of 21 nt. Si RNA	Viral dsRNA, si RNA
DCL3	RNase III, dsRNA-binding	Synthesis of 24 nt. Si RNA	Chromatin
DCL4	RNase III, dsRNA-binding, Chelicase, paz	Synthesis of 21 nt. Si RNA	Ta-si RNA, PTGS

Memelilerde ve bitkilerde dicer genlerinin farklılığı hücre kopyalanmasında farklı stratejilerin kullanıldığını göstermektedir (30). DCL'lerin yapısında çekirdeğe lokal sinyal bölgeleri (NLS), iki helikas alanı (DExC ve C), PAZ alanı (PIWI, Argonaute ve ZWille), iki alan RNase III (alan a ve b) ve iki alan da dsRNA bağlayıcı sekansı bulunmaktadır.

## NLS Chelicase PAZ RNase III dsRNA-binding



Şekil 4. DCL enziminin genel yapısı ( yeniden oluştur)

Bunlara ilave olarak DCL'ler bitki, hayvan ve funguslarda fonksiyonları tam olarak bilinmeyen Duf283 alanına sahiptir. DCL2 başlangıçta sahip olduğu dsRNA bağlayıcı sekansı ile dsRNA'lar ile bağlantı kurar. Daha sonra iki adet RNase III bölgesi birer molekül oluştururken, PAZ bölgesi de iki adet 3'terminal çekirdek çıkıntısı sayesinde dsRNA ile özel interaksiyonlar sağlar. Molekülleşme sonucunda RNase III dsRNA'nın her bir kolunu 3'ucundan ve mono fosfat 5'ucundan siRNA'ya özelleşmiş 2nt'lik çıkıntılar olacak şekilde böler.

Bitki hücresi için DCL1'in önemi araştırmalar ile doğrulanmıştır. DCL1 sadece miRNA'nın gelişimine bağlı değildir aynı zamanda sitoplazmik RNA toplanmasının düzenlenmesinde de rol oynar. Bu durumda DCL2, DCL3 ve DCL4 tam anlamda DCL1'in yerine kullanılamaz. Pri-mi RNA'lar ve uzun sitoplazmik RNA'lar hücrel veya viral her ikiside hairpinler içerirler. Hairpinler ise DCL1'in reaksiyona girmesinde etkilidir (31).

### Argonaute ve RISC (RNA Induce Silencing Complex)

Dicer tarafından üretilen kısa RNA'lar RNA Induce Silencing Complex (RISC)'e dahil edilmektedir. RISC'in bir başka ana bileşeni Argonaute (Ago)'proteinidir. Çoğu Eukaryotik canlıda birçok Ago benzeri genler bulunmaktadır. Mayalar tek kopya Ago genine sahip olmasına karşın, insanlarda 8, *A.thaliana*'da 10, *D.melanogaster*'de 5 ve *C. elegans*'da 27 Ago benzeri protein bulunmaktadır. Bilindiği gibi Ago proteinleri sadece RISC kompleksine özel proteinlerdir.

Bu durum farklı Ago proteinlerinin farklı RISC fonksiyonları oluşturduğunu düşündürmektedir. PIWI ve PAZ bölgeleri bütün Ago proteinlerinin en temel bileşenleridir. Hayvanlarda mRNA'nın baskılanmasından miRNA sorumlu iken bitkilerde mRNA ile ilişkili miRNA'nın tamamladığı RISC bu fonksiyonu organize etmektedir. *A.thaliana*'da bulunan on adet Ago proteini içerisinde Ago 1 proteini dsRNA'yı bölmek için en iyi adaylardan bir tanesidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar da Ago 1 proteinin PIWI bölgesinin diğer protein faktörleri olmaksızın miRNA'nın varlığında hedef mRNA'yı kesme kabiliyetinde olduğu görülmüştür.

DCL1 ile bulunması durumunda Ago1 üretimi diğer kısa miRNA (miR168 gibi)'lar tarafından geri besleme yoluyla düzenlenmektedir. Ago 1 düzenlenmesinin iki aşamada gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan birinci aşama Ago 1 ve miR168 genlerinin birleşmesi, ikinci aşama ise Ago1'in sentezlenmesi yoluyla miR168 gen birikmesinin dengelenmesidir (10).

## RNA Bağlı RNA Polimeraz (RdRp)

RNA bağlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi bir RNA kalıbı üzerine RNA'yı sentezleyen bir enzimdir. RdRp enziminin varlığı ve fonksiyonları kırk yılı aşkın bir süreden beri bilinmektedir. RdRp enzimi yapılan özel çalışmalar ile bitki virüslerinde ortaya çıkartılmıştır. Başlangıç bulguları açıklanamamasına rağmen, bitki genomlarının RdRp enzimini sentezledikleri anlaşılmıştır. Bu enzim bir stres enzimi olduğundan yaralı ve virüs ile enfekteli bitkilerde aktivitesi artmaktadır. RdRp enziminin geni domateslerden klonlanmış ve sekanslanmıştır. Gen susturulmasının keşfi bu enzime ilginin yeniden artmasına sebep olmuştur. RdRp enziminin Eukaryotik hücrelerde sadece nükleik asit dışı genlerin susturulması ile sınırlı kalmayıp aynı zamanda hücre genomunu da düzenlediği düşünülmektedir (11, 12).

## Bitkilerde Gen Susturulması Göstergesi Olarak Pektin Metilesteraz

Bitki gen susturulmasında rol oynayan bir diğer stres proteini de pektin metilesteraz enzimidir. Bu enzim bir hücre duvarı enzimidir ve canlının gelişimi için gereklidir. Bitkilerin hücre duvarı başlangıçta seluloz, hemiseluloz ve pektin içermektedir. Pektin poligalacturonik asidin alt dallarından meydana gelmektedir. Pektin bileşenleri golgi sisteminde sentezlenmektedir.

Bitki genomu birçok pektin metilesteraz genini bulundurmaktadır. Enzim öncü olarak sentezlenmektedir. Bitki mekanik olarak yaralandığı zaman pektin metilesteraz genlerinin kopyalanması anormal bir şekilde artmaktadır. Olgunlaşmış enzim hücre duvarında toplanmakta ve enzimatik aktivitesi yükselmektedir. Bitki pektin metilesteraz enzimi 10 - 100 aminoasit arasında değişen boyutlarda lider bölgeye sahiptir (7). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitki hücrelerinde virüs enfeksiyonlarının kontrolünde pektin metilesteraz enziminin etkili olduğu belirtilmiştir. Enzimlerin *Tobacco mosaic virus*'ün proteinin nakli ile ilişkili olduğu ve virüs enfeksiyonunun bitkide yayılmasında rol oynadığı ispatlanmıştır (32, 33). Ancak pektin metilesteraz enziminin rolü bu fonksiyon ile sınırlı değildir. Hücre duvarında pektin metilesterazın aktivasyonunun *Tobacco mosaic virus*'ün RNA'sını susturduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda siRNA'ların birikmesinin viral RNA'nın yoğun bir şekilde değretasyonuna neden olduğu ve bu değretasyonun çekirdek içerisine taşınan DCL1 ile pektin metilesteraz interaksyonu tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Genellikle bu olay sitoplasmada siRNA'nın hızlı bir şekilde toplanmasına yol açmaktadır. Hücre duvarında dış sinyalleri alabilme kabiliyeti olan bu enzim, hücreye yabancı bir nükleik asit girdiği zaman bir sinyal oluşturur. Sonuç olarak hücre mobilize olur ve gen sessizleştirilmesi teşvik edilmiş olur (30).

## RNA Polimeraz IV

Bitkilerde gen susturulmasının mekanizmalarından biriside genomik DNA metilasyonu olayıdır. Bu gen susturulması mekanizması *A. thaliana* da üç grup faktörü gerektirmektedir. Bu gruplar: DNA metiltransferase enzimi, histon değişim enzimi ve DRD1, DRD2 ve DRD 3 enzimleridir. DRD2 ve DRD3 RNA polimerase 4'ün altbirimleri olmasına karşın DRD1 kromatinin yeniden modellenmesinde gerekli bir enzimdir. DRD2 ve DRD3 enzimleri NRPD1a, NRPD2a (DRD2) ve NRPD1b

(DRD3) altbirimlerini içermektedir. RNA polimerase IV enziminin fonksiyonu onun alt birimlerinin kompozisyonuna bağlıdır. RNA polimeraz 4a NRPD1a ve NRPD2a içermektedir ve bu siRNA çoğaltılmasında gereklidir. RNA polimeraz 4b NRPD1b ve NRPD2a içerir ve siRNA'nın DNA metilasyonunu ve kromatinin yeniden modellenmesini emniyetli bir şekilde yapması için DRD1 ile birlikte hareket eder (34).

## **Viral Gen Susturulmasının Baskılanması**

Virüsler hücre savunma sistemini yıkmak için hep özel stratejilere ihtiyaç duymuştur. Viral RNA'yı deşretasyondan koruyan her mekanizma prensip olarak gen susturulmasından korunmanın bir mekanizması olarak kabul edilebilir. Eğer PTGS bitkilerde anti-viral bir savunma mekanizması ise bazı bitki virüslerinin bu savunmaya karşı savunma geliştirmeleri beklenir. Gen susturulmasının baskılanması için virüsler çeşitli proteinleri, coat proteinleri, replikative artırıcıları, çok genel taşıyıcı proteinler ve patojenik faktörleri kullanmaktadır. Taşıyıcı proteinler viral genetik metaryalin hücreden hücreye geçişini kolaylaştırmak için plasmodesmataları açarlar. Bu yaklaşımı destekleyen ve PTGS'nin baskılanmasını kotlayan bitki virüsleri tespit edilmiştir. PTGS'nin viral baskılayıcılar tarafından baskılanması uzun mesafelere hareket edebilen floemden virüsün giriş ve çıkışını organize etme fonksiyonunda ki proteinler tarafından yönlendirilmektedir. Bu baskılanma mekanizması PTGS ile floemde hareket arasındaki ilişkiye dayandırılmaktadır. Susturma sinyalleri floem de taşınmaktadır. Baskılayıcı proteinler bu sinyallerin hareketini engellemektedirler. Böylece sistemik PTGS oluşmamaktadır. *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV) ve *Cymbidium ringspot virüs* (CRV) gibi virüslerin güçlü gen susturulması engelleyici proteinlere sahip oldukları belirlenmiştir. Bu gen susturmasını bastırıcı virüsler gen susturulma mekanizmasından sonra harekete geçmektedirler. Bu yüzden hücrede viral dsRNA birikmesini artırmalarına rağmen gen susturulmasını engelleyememektedirler (35, 36).

## **Bitki Patojeni Virüslerde Gen Susturulması Uygulamaları**

Scorza ve ark. (2001) (37) yaptıkları çalışmada; *Plum pox virüs* coat protein geni içeren transgenik eriklere PPV inokule etmişlerdir. Transgenik C5, dört yıl boyunca yapılan testlemelerde yüksek seviyede dayanıklılık göstermiştir. Bu klonda; çekirdekte yüksek seviyede transgen kopyalaması, sitoplazmada düşük seviyede transgen mRNA birikmesi, kompleks transgen insörtün anormal kopyaları ve susturulmuş PPV- coat protein (CP) transgenlerin metilasyonu dahil olmak üzere PTGS'nin tipik karakterleri tespit edilmiştir. PPV-CP genlerinin C5 fidanlarında metillendiği ve bu fidanların PPV'ye karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları odunsu çok yıllık türlerde virüs dayanıklılığında PTGS mekanizmasının sonuç verdiğini göstermiştir.

Fagoaga ve ark (2005) (38) yaptıkları çalışmada; öncelikle CTV virüsünde p23 geninin Meksika Limonlarında virüsün yaprak simptomlarını kontrol ettiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada birbirinde ayrı normal fenotipte beş limon çeşidinin tipik karakterde PTGS gösterdiği tespit etmişlerdir. Bu limonlarda transgenlerin birden fazla kopyaları, mRNA'ya benzeyen küçük yapılar, susturulmuş transgenlerin metilasyonu ve p23 genine özel siRNA'lar tespit edilmiştir. Aşı ve afitler ile CTV

inokule edilmiş ve susturulmuş bazı limon hatlarından elde edilen fidanlarda virüse karşı immunité tespit edilmiştir. Bu fidanlarda ELISA ve Northern blot yöntemleri ile yapılan testlemelerde simptomlar görülmediği gibi viral RNA birikmesinde tespit edilmemiştir.

Ruanjan ve ark. (2006) (39) yaptıkları çalışmada; *Papaya ring spot virus* (PRSV)'ün coat protein genini taşıyan transgenik papaya bitkilerini PRSV ile inokule etmişlerdir. Enfeksiyon RT-PCR ve gelişmiş teknikler ile kontrol edilmiştir. Test edilen klonlar arasında G2 klonu üç yıl boyunca yapılan testlemelerde virüs enfeksiyonuna karşı yüksek oranda dayanıklı bulunmuştur. Özel analizlerle bu klonun anormal kopyaları ile ilişkili birden çok transgen kopyaları açığa çıkartılmıştır. Bu durumda şüphelenilen PTGS siRNA'ların tespiti ile ispatlanmıştır.

Nazmul Haque ve ark (2006) (40) yaptıkları çalışmada; öncelikli olarak *Sweet potato feather mottle virus*'ün coat proteinini taşıyan *N. benthamiana* bitkilerinde RNA susturulması için özel hedeflerin aşısı ile taşındıkları tespit edilmiştir. Aşılama sonrası RNA susturulmasının geçişliliğinin tespiti için bu bitkilerden iki adet susturulmuş, iki adet de susturulmamış bitki seçilmiştir. Susturulmamış transgen aşısı kalemleri, susturmayı teşvik edici anaçlar üzerine aşılansmıştır. Susturulmamış aşısı kalemleri, susturmayı teşvik eden anaçlar üzerine aşılansıkları zaman susturulmamış kalemlerde RNA susturulmasının tetiklendiği ve yayıldığı tespit edilmiştir.

Abhary ve ark (2006) (41) yaptıkları çalışmada; TYLCV'nin kontrolünde PTGS'nin fonksiyonunu incelemişlerdir. TYLCV'nin genomundan kodlanamayan bir bölge farklı virüslere karşı dayanıklılığı tetikleyebilecek şekilde yapılandırılmıştır. Sonra bu genom parçası vektör virüse yüklendikten sonra *Agrobacterium* aracılığı ile infiltrasyon yöntemi ile domates ve tütün bitkilerine inokule edildi. İnokulasyondan sonra beyaz sineklerle TYLCV inokulasyonu yapılan bitkilerde bu virüse karşı yüksek seviyede dayanıklılık tespit edilmiştir. Yapılan PCR testlemelerinde bitkilerde TYLCV'ye özel siRNA'ların varlığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada PTGS mekanizmasında VIGS metodunun geminivirüslere dayanıklı bitki eldesinde başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Yaegashi ve ark (2007) (42) yaptıkları çalışmada; Green fluorescent protein (GFP) ifade eden tütün bitkilerinde VIGS mekanizmasının analizi için yine GFP ifade eden *Apple latent spherical virus* (ALSV) kullanılmıştır. ALSV-GFP enfeksiyonunun tütün bitkilerinde transgen GFP geninin VIGS mekanizması ile susturulmasının etkili bir şekilde tetiklediği tespit edilmiştir. GFP- susturulmuş yapraklarda yapılan analizde viral RNA ve proteinlerin bütün yaprakta birikmiş olduğu tespit edilmiştir. Ancak bitkideki GFP mRNA'larının degrades olduğu bildirilmiştir. Örneklerde ALSV RNA'sının siRNA'ları tespit edilemezken GFP RNA'sının siRNA'larının kolaylıkla tespit edildiği bildirilmiştir. Analizler sonucu GFP- tütün bitkilerinin enfekteli yapraklarında GFP-ALSV'nin yayılmasının VIGS'in başlamasından daima önce olduğu tespit edilmiştir.

Shu Ling ve ark. (2008) (43) yaptıkları çalışmada; öncelikle GLRaV-2'nin genomunun sekansını çıkartarak coat protein genini tanımlamışlardır. Kırk yedi T0 transgenik *N. benthamiana* bitkisi GLRaV-2'nin coat protein geni *Agrobacterium* aracılığı ile transformasyon edildikten sonra rejeneré edilmiştir. Serada yetiştirilen T1 ve T2 bitkilerine mekanik olarak GLRaV-2 inokule edilerek hastalığa dayanıklılık geliştirilmiştir. İnokule edilmiş transgenik olmayan bitkilerin tamamı inokulasyondan

2-4 hafta sonra simptom vermesine rağmen, transgenik bitkilerin büyük çoğunluğu (21 T1 bitkisinden 14 tanesi) yapılan testlemede enfekteli bulunmamıştır. T2 bitkilerinde de virüse dayanıklılık tespit edilmesine rağmen, T1 bitkilerine göre % oran daha düşük tespit edilmiştir.

Yapılan testlemeler sonucu dayanıklılığın PTGS mekanizmasının içerisinde transgen RNA kopyalama ile düşük seviyede ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada GLRaV-2 enfeksiyonuna karşı transgenik bitkilerin gelişimi ve GLRaV-2'nin coat protein genin ifadesinin transgenik *N. benthamiana* bitkisindeki gelişimi tanımlanmıştır. Sonuç olarak transgenik *N. benthamiana* bitkilerindeki GLRaV-2'ye karşı dayanıklılığın PTGS mekanizmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

## Sonuç

Gen susturulması veya daha açık olarak RNA susturulması diğer eukaryotik canlılardan daha çok bitkilerde görülen bir dayanıklılık mekanizmasıdır. Özellikle PTGS virüslere karşı etkin bir dayanıklılık mekanizması olarak düşünülmektedir.. Bitkiler bağışıklık sistemini artıran maddelerden yoksun olduklarından dolayı, etkin bir gen susturulması mekanizmasının gelişmesi bu organizmalarda hayvanlardan daha önemli olduğu düşünülmektedir.

Gen susturulması ile normal gen düzenlenmesi arasında ki ilişki tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. PTGS ve TGS olarak kabul edilen mutantlar sağladıkları bilgiler ile bu ilişkinin açığa çıkmasına yardımcı olacaklardır. Fakat bu stratejiler ne gen susturulmasına bağlı hastalık dayanıklılıklarını nede gen düzenlemeleri ve RNA susturulması arasındaki farkı açıklamak için yeterli değildir.

Normal gen düzenlenmesi ve gen susturulması arasında ki farkların anlaşılmasında en büyük problem iç genlerden açıkça ayırt edilemeyen yabancı DNA'lar tarafından oluşturulan belirsiz düzenlemelerdir. Ancak virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması (VIGS) mekanizmasının keşfi ile birlikte genel gen susturulması mekanizmaları daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. VIGS'in sonuçları gen fonksiyonlarının analizinde başlangıç noktasıdır.

Bu çalışmalar genin özel hususiyetleri ile ilgili bazı bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması, enfeksiyon metotları ve vektörlerinin geliştirilmesi ile birlikte, bu mekanizmalar bitki hastalık dayanıklılıklarında ve büyük çaplı gen susturulması projelerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Geçmiş yıllarda VIGS mekanizmasının anlaşılabilir modellerinde özel süreçler arasında genetik ve moleküler biyolojik yaklaşımlar kombine edilerek çalışmalar yürütülmüştür. Ayrıca raportör gen sisteminin tespit edilmesi VIGS'in sağlamlığını ve etkisini artmasına neden olmuştur. Gelecekte VIGS mekanizması çok daha önemli çalışmalarda kullanılacaktır. Son yıllarda başta VIGS olmak üzere gen susturulması mekanizmaları. Bitki patojen virüslerin mücadelesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (20, 45).

## Kaynaklar

- 1- Agrios, G. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press. 922p.
- 2-Ertunç, F., İlhan, D. 1997. Bitki virüs hastalıklarına dayanıklılığın genetiksel yönleri. Yankı Matbacılık.23s.
- 3- Lu, R., Malcuit, I., Moffet, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., Baulcombe, D.C. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance . EMBO J. 22:5690–5699.
- 4- Değirmenci, K., Güldür, M.E. 2006. Hıyarlarda *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)'ün çapraz koruma (cross protection) ile kontrolü. BİTKİ KORUMA BÜLTENİ 2006, 46 (1-4): 13-23
- 5- Jana, S., Chakraborty, C., Nandi, S. 2004. Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. Electronic Journal of Biotechnology. ISSN:0717-3458
- 6- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. Nature. 431, 356–363.
- 7- Dorokhov, Y.L., Skurat, E.V., Frolova, O.Y., Gasanova, T.V., Ivanov, P.A., Ravin, N.V., Skryabin, K.G., Makinen, K., Klimyuk, V., Gleba, Y.Y., Atabekov, J.G. 2007. Role of the leader sequences in tobacco pectin methylesterase secretion. FEBS Lett. 580:3329–3334.
- 8- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implication for regulation of gene expression and virus resistance. Plant Cell. 5: 1749-1759.
- 9- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., Gril, L.K. 1995. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:1679–1683.
- 10- Baumberger, N., Baulcombe, D.C. 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 11928–11933
- 11- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Varallyay, E., Lacomme, C., Burgyan, J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single stranded viral RNAs. J. Virol. 79: 7812–7818.
- 12- Ho, T., Pallett, D., Rusholme, R., Dalmay, T., Wang, H. 2006. A simplified method for cloning of short interfering RNAs from *Brassica juncea* infected with *Turnip mosaic potyvirus* and *Turnip crinkle carmovirus*. J. Virol. Meth. 136: 217–223.
- 13- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 75: 843–854.
- 14- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E. 2003. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science. 299: 716–719.
- 15- Cai, X.Z., Xu, Q.F., Wang, C.C., Zheng, Z. 2006. Development of a virus-induced gene silencing system for functional analysis of the RPS2 dependent resistance signalling pathways in *Arabidopsis*. Plant. Mol. Biol. 62:223–232.



- 16- Fu, D.Q., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Jiang, W.B., Luo, Y.B. 2005. Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.* 43:299–308.
- 17- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I.E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K., Lacomme, C. 2005. Virus – induce gene silencing based functional characterization of gene associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant physiol.* 138:2155–2164.
- 18- Constantin, G.D., Krath, B.N., MacFarlane, S.A., Nicolaisen, M., Johansen, I.E., Lund, O.S.. 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J.* 40:622–631.
- 19- Fofana, I.B., Sangare, A., Collier, R., Taylor, C., Fauquet, C.M. 2004. A Geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant mol. Biol.* 56:613–624.
- 20- Shao, Y., Zhu, H.L., Tian, H.Q., Wang, X.G., Lin, X.J., Zhu, B.Z., Xie, Y.H., Luo, Y.B. 2008. Virus-Induced gene silencing in plant species. *Russian Journal of Plant Physiology.* 55:168–174.
- 21- Ruiz, F., Vayssie, L., Klotz, C., Sperling, L., Madeddu, L. 1998. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell.* 9:931-943.
- 22- Johnson, J. 1992. The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology.* 12:438–440.
- 23- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., Maule, A.J. 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a *Potato virus X* vector. *Plant J.* 25:417–425.
- 24- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., Dougherty, W.G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell.* 6:1441-1453.
- 25- English, J.J., Mueller, E., Baulcombe, D.C. 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell.* 8:179-188.
- 26- Covey, S.N., Al-Kaff, N., Langara, A., Turner, D.S. 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 38:781-782.
- 27- Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R., Dale, P.J. 1998. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science.* 279:2113-2115.
- 28- Benedito, V.A., Visser, P.B., Angenent, G.C., Krens, F.A. 2004. The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Gen. Mol. Res.* 3:323-341.
- 29- Margis, R., Fusaro, A.F., Smith, N.A., Curtin, S.J., Watson, J.M., Finnegan, E.J., Waterhous, P.M. 2006. The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett.* 580: 2442–2450.
- 30- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Gren, P.J., Jacobsen, S.E. 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* 38:721–725.

- 31- Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., Poethig, R.S. 2003. HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*. 130: 1493–1504.
- 32- Dorokhov Yu, L., Makinen, K.M., Frolova, O.Y., Merits, A., Kalkkinen, N., Saarinen, J., Atabekov, J.G., Sarma, M. 1999. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: The host-cell receptor for the *Tobacco mosaic virus* movement protein. *FEBS Lett*. 461:223–228.
- 33- Chen, M.H., Citovsky, V. 2003. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J*. 35: 386–392.
- 34- Huettel, B., Kano, T., Daxinger, L., Aufsatz, W., Matzke, A.J.M., Matzke, M. 2006. Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and RNA polymerase IV in *Arabidopsis*. *EMBO J*. 25:2828–2836.
- 35- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C., Chen, X. 2006. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*. 580: 3117–3120.
- 36- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T. 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J*. 24: 3147–3157.
- 37- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K., Ravelonandro, M. 2000. Post-transcriptional gene silencing in *Plum pox virus* resistant transgenic European plum containing the *Plum pox potyvirus* coat protein gene. *Transgenic Research*. 10:201–209
- 38- Fagoaga, C., Lopez, C., Hermoso de Mendoza, A. 2006. Post – transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology*. 60:153–165
- 39- Ruanjan, P., Kertbundit, S., Kuricek, M. 2005. Post-transcriptional gene silencing is involved in resistance of transgenik papayas to *Papaya ringspot virus*. *Biometals* 14:33–42.
- 40- Haque, N., Tanaka, Y., Sonoda, S., Nishiguchi, M. 2006. Analysis of transitive RNA silencing after grafting in transgenic plants with the coat protein gene of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Plant Mol Biol*. 63:35-47
- 41- Abhary, M.K., Ankoka, G.H., Nakhla, M.K., Maxwell, D.P. 2006. Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the Tomato yellow leaf curl virus complex. *Arch Virol*. 151:2349–2363
- 42- Yaegashi, H., Yamatsuta, T., Takahashi, T., Li, C., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S., Yoshikawa, N. 2007. Characterization of virus induce gene silencing in tobacco plants infected with *Apple latent spherical virus*. *Arch Virol*. 152:1839–1849.
- 43- Shu Ling, K., Ying Zhu, H., Gonsalves, D. 2008. Resistance to *Grapevine leafroll associated virus – 2* is conferred by post-transcriptional gene silencing in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic Res*. 17:733-740
- 44- Wassenegger, M. 2002. Gene silencing-based disease resistance. *Transgenic Research*. 11:639–653.