

ANNA GÓRA, WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI

*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa*

WIROID WRZECIONOWATOŚCI BULW ZIEMNIAKA — STRUKTURA A PATOGENNOŚĆ

WSTĘP

W latach 1917-1923 w Maine w Stanach Zjednoczonych zaobserwowano pojawienie się nowej choroby ziemniaka (DIENER 1979). Porażone rośliny karłowaciały, ich liście były wydłużone i skrzycone, a bulwy mniejsze i wrzecionowate. Choroba rozprzestrzeniała się szybko, główną drogą zakażenia był bezpośredni kontakt rośliny chorej ze zdrową. Stwierdzono też, że czynnik infekcyjny przenosi się łatwo przez skażone sokiem chorej rośliny narzędzia rolnicze. Infekcja była przenoszona także w wyniku szczepienia infekcyjnymi zrazami, przez pyłek zakażonych roślin i wegetatywnie — przez bulwy. Dalsze badania wykazały, że czynnik wywołujący wrzecionowatość bulw ziemniaka występuje wśród dziko rosnących w Ameryce Południowej i Północnej gatunków z rodziny *Solanaceae*. Jego rozprzestrzenianie się w naturalnych, bogatych ekosystemach jest jednak ograniczone. Wprowadzenie monokultur ziemniaka i rozwój technik rolniczych umożliwiły rozprzestrzenianie się choroby.

Przez ponad pięćdziesiąt lat usiłowano wyodrębnić czynnik zakaźny, przypuszczając, że patogen ten jest wirusem roślinnym. Stwierdzono jednak, że nie ma on właściwości immunogennych, jest niewrażliwy na działanie proteaz, DNaz i fenolu, ulega natomiast inaktywacji pod wpływem działania RNaz. To sugerowało, że czynnikiem infekcyjnym jest wolny kwas rybonukleinowy, w przeciwieństwie do wirusów nieobiałczony. Własności badanego czynnika okazały się więc tak niekonwencjonalne, że dla tej grupy patogenów utworzono nowy termin — wiroidy (DIENER 1979), zaś patogen wywołujący tę chorobę ziemniaka nazwano wiroidem wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. potato spindle tuber viroid, PSTVd). Patogeny te różnią się od typowych wirusów, bowiem ich materiał genetyczny to cząsteczka jednoniciowego RNA złożonego z około 250-375 nukleotydów, nie kodująca żadnych białek a mimo to replikująca się w komórkach gospodarza i wywołująca swoistą chorobę rośliny (DIENER 1987, SEMANCIK 1987). Tak więc całość informacji genetycznej jest zawarta w strukturze pierwszo- i drugorzędowej RNA. Patogeny te powodują infekcje o podobnych objawach i sposobie przenoszenia w uprawach pomidorów, ogórków, awokado, palm kokosowych, tytoniu, owoców cytrusowych i winorośli. Poniżej przedstawiono

wybrane wiroidy należące do różnych grup, wyodrębnionych na podstawie podobieństwa sekwencji RNA oraz występowaniu charakterystycznych regionów w cząsteczkach wiroidów (SYMONS 1991).

Grupa ASBV

podgrupa ASBV

- ASBVd — wiroid skazy słonecznej awokado (ang. avocado sunblotch viroid)

Grupa PSTV

podgrupa PSTV

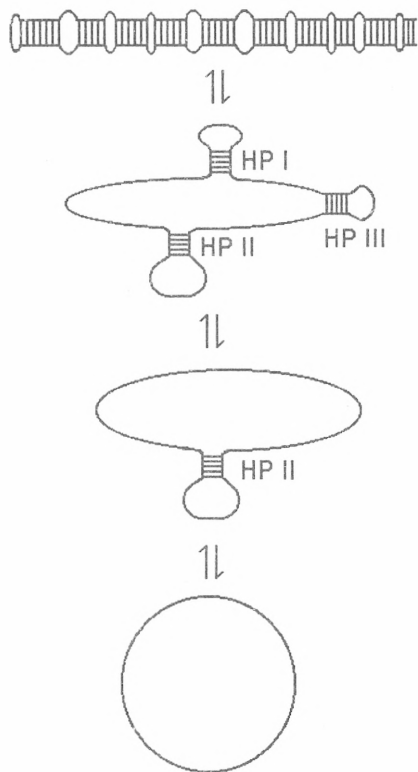
- CSVd — wiroid karłowatości złocieni (ang. chrysanthemum stunt viroid)
- CEVd — wiroid łuszczyca kory cytrusów (ang. citrus exocortis viroid)
- CCCVd — wiroid kadang-kadang kokosów (ang. coconut cadang-cadang viroid)
- CTiVd — wiroid tinangaja kokosów (ang. coconut tinangaja viroid)
- CPFVd — wiroid bladeści owoców ogórka (ang. cucumber pale fruit viroid)
- HLVd — utajony wiroid chmielu (ang. hop latent viroid)
- HSVd — wiroid karłowatości chmielu (hop stunt viroid)
- PSTVd — wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. potato spindle tuber viroid)
- TASVd — wiroid wierzchołkowej karłowatości pomidorów (ang. tomato apical stunt viroid)
- TPMVd — wiroid planta-macho pomidorów (ang. tomato planta macho viroid)

podgrupa ASSV

- ASSVd — wiroid bliznowacenia skórki jabłek (ang. apple scar skin viroid)
- GYSVd — wiroid żółtej plamistości winorośli (ang. grapevine yellow speckle viroid)

Genom PSTVd stanowi jednoniciowy, koliście zamknięty RNA o długości 356–360 nukleotydów. Na podstawie struktury pierwszorzędowej po uwzględnieniu danych dotyczących trawień enzymatycznych i modyfikacji chemicznej RNA wiroida zaproponowano model struktury drugorzędowej cząsteczki PSTVd (RIESNER i współaut. 1979). Cząsteczka wiroida ma pałeczkowatą formę o strukturze w przeważającej części dwuniciowej bowiem około 70% zasad tworzy pary nukleotydowe, w tym najwięcej typu G:C (ryc. 1). Badania procesu denaturacji termicznej PSTVd i innych wiroidów wykazały istnienie kilku struktur pośrednich pomiędzy formą pałeczkowatą a kołową całkowicie zdenaturowaną (HENCO i współaut. 1979), (ryc. 1). Jedną z nich, zawierającą trzy dwuniciowe fragmenty typu „szpilek” (z ang. zwane HPI, HPII, HPIII), ma duże znaczenie biologiczne. Uważa się bowiem, że struktura taka jest tworzona w czasie replikacji RNA PSTVd i ma kluczowe znaczenie dla tego procesu. Przypuszcza się, że w obrębie sekwencji szpilki HPI znajduje się miejsce cięcia oligomerycznych replikacyjnych form pośrednich i ligacji powstałych monomerycznych odcinków w ostateczne formy kołowe (DIENER 1986). Szpilka II może być miejscem wiązania niezidentyfikowanego jeszcze czynnika kodowanego przez roślinę gospodarza, ułatwiającego transkrypcję macierzystego genomu PSTVd (Loss i współaut. 1991). Wiroidy niosące sekwencje tworzące typowe struktury szpilki II infekują ten sam zasięg

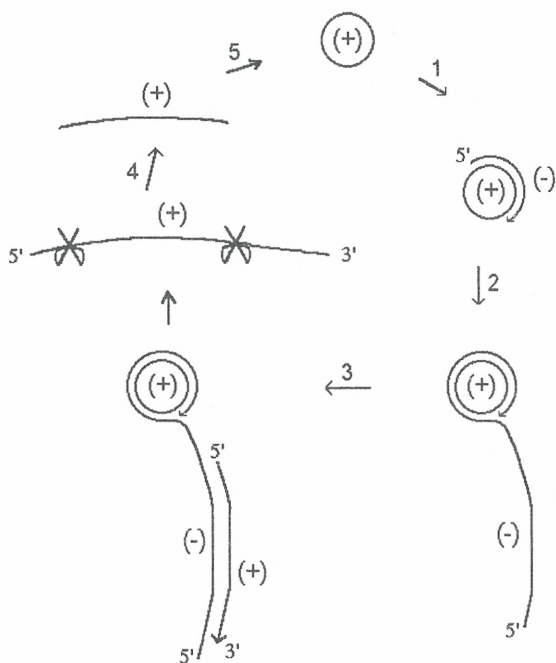
roślin — gospodarzy (ziemniak i pomidor). Szpilki II nie stwierdza się na przykład w wiroidzie karłowatości chmielu. Tak więc istnienie sekwencji tworzących szpilkę II może być adaptacją do namnażania się wiroida w komórkach swojego gospodarza.



Ryc. 1. Etapy denaturacji RNA PTVd. HP I, HP II, HP III — struktury typu „szpilek” (ang. hairpins) stabilizujące pośrednią formę przestrzenną pomiędzy cząsteczką pałeczkowatą a kolistą, całkowicie zdenaturowaną.

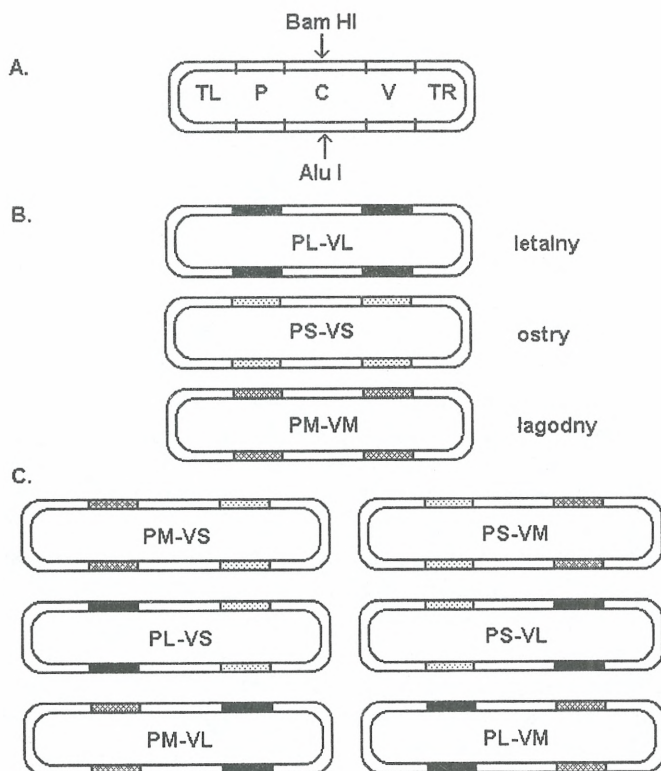
Replikacja RNA wiroidowego w komórce przebiega według mechanizmu tak zwanego obracającego się koła (ang. rolling circle) (BRANCH i współaut. 1988), najprawdopodobniej z udziałem enzymu gospodarza polimerazy II RNA zależnej od DNA (SCHINDLER i MÜHLBACH 1992). Schemat replikacji przedstawiono na rycinie 2. Na matrycy wiirającej do komórki kolistej cząsteczki (+) RNA wiroida zachodzi synteza oligomerycznych nici (-) RNA. Nici te są matrycami do syntezy oligomerycznych nici (+) RNA, które po fragmentacji do monomerycznych liniowych cząsteczek ulegają cyrkularyzacji. Sam mechanizm cięcia oligomerycznych nici RNA PSTVd nie jest znany.

Porównanie sekwencji wiroidów należących do grupy PSTVd umożliwiło wyróżnienie 5 regionów cząsteczki tak zwanych domen, którym przypisuje się określone funkcje (KEESE i SYMONS 1985), (ryc. 3 A). Domena C, to tak zwany centralny region konserwatywny CCR (ang. central conserved region). W obrębie tej domeny występuje wspomniana już struktura szpilki I — istotna w procesie cięcia oligomerycznych form replikacyjnych. Domena P (patogenności) wpływa na stopień zjadliwości wiroidów. Domena V, tak zwany region zmienności, prawdopodobnie moduluje patogenność. Domeny terminalne TR (prawa) i TL



Ryc. 2. Schemat replikacji RNA PSTVd.

Wnikająca do komórki kolista, monomeryczna cząsteczka (+) RNA służy jako matryca do syntezy długich, oligomerycznych nici (-) RNA (etap 1 i 2), na których powstają oligomeryczne nici (+) RNA (etap 3). Oligomery RNA (+) po fragmentacji na odcinki o długości genomu wiroida — monomery (etap 4) ulegają cyrkularyzacji (etap 5).



Ryc. 3. Budowa analizowanych genomów PSTVd.

[A] Ogólny model budowy cząsteczki wiroida z zaznaczonymi strukturalnymi domenami: C, P, V, TR, TL oraz miejscami cięcia rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne *Bam*HI, *Alu*I. Miejsca te zostały wykorzystane do konstrukcji hybrydowych cząsteczek PSTVd. [B] Genomy wyjściowe (letalny, ostry, łagodny). [C] Genomy hybrydowe (chimery).

(lewa) prawdopodobnie uczestniczą w zdarzającej się międzycząsteczkowej rekombinacji i rearanżacji RNA wiroidów. Strukturę tych domen wiąże się również z przemieszczaniem się wiroida w roślinie (SEMANCIK 1987).

RÓŻNORODNOŚĆ GENOMU PSTVd

W 1978 opublikowano pełną sekwencję genomu pierwszego wiroida. Był to wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka PSTVd-DI, należący do szczepu pośredniego (GROSS i współaut. 1978). Od tamtej pory poznano już sekwencję około 20 różnych izolatów PSTVd (GROSS i współaut. 1981, HEROLD i współaut. 1992, LAKSHMAN i TAVANTZIS 1993, GÓRA i współaut. 1994). W porażonych roślinach izolaty te wywołują objawy chorobowe, które możemy określić jako łagodne, pośrednie, ostre i letalne. Najbardziej widocznym objawem porażenia jest zahamowanie wzrostu rośliny, skrócenie liści i ich zwieszanie się oraz nekrozy. Bulwy porażonych ziemniaków są mniejsze i mają wrzecionowaty kształt. Natężenie objawów chorobowych zależy od szczepu wiroida oraz od gatunku rośliny (PFANNENSTIEL i SLACK 1980, KOWALSKA-NOORDAM 1986/1987). Rośliną silnie reagującą na zakażenie PSTVd jest pomidor odm. Rutgers, będący rośliną wskaźnikową do badania biologii zakażenia tego wiroida.

W 1991 roku w Zakładzie Biosyntezy Białka Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN rozpoczęto badania trzech różnych fenotypowo izolatów PSTVd pochodzących z kolekcji Instytutu Ziemniaka w Młochowie (GÓRA i współaut. 1994). Izolat ostry PSTVd-S XIII w zainfekowanej roślinie wskaźnikowej powoduje wystąpienie ostrych objawów zakażenia, takich jak: karłowatość rośliny, silne skrócenie liści oraz rozległe nekrozy nerwów. Izolat typu pośredniego PSTVd-I 818 wywołuje podobne objawy o niższej ostrości, natomiast izolat łagodny PSTVd-M, poza nieznaczną epinastią (zwieszanie się liści) nie daje żadnych objawów porażenia.

RNA PSTVd tych trzech izolatów otrzymany z zakażonych roślin wskaźnikowych posłużył do syntezy pełnej długości kopii DNA (cDNA) PSTVd. Pierwszą nić cDNA otrzymano poprzez odwrotną transkrypcję RNA wiroidowego, drugą nić — poprzez amplifikację cDNA metodą PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy). W obu reakcjach zastosowaliśmy specyficzne startery (ang. primers) o sekwencji komplementarnej do regionu konserwatywnego CCR. Odpowiednie dobranie starterów umożliwiło otrzymanie pełnej długości monomerycznych cząsteczek cDNA wiroida. Otrzymane cDNA sklonowano w bakteryjnym wektorze plazmidowym pUC9 w sposób umożliwiający uzyskanie infekcyjnych plazmidowych kopii cDNA PSTVd (CANDRESSE i współaut. 1990, TABLER i SÄNGER 1984). Tabela 1 przedstawia wyniki sekwencjonowania sklonowanego cDNA PSTVd. Izolat łagodny PSTVd-M był molekularnie homogeny, bowiem tylko jeden wariant sekwencyjny typu M został wykryty w trakcie sekwencjonowania. Izolaty: pośredni PSTVd-I 818 oraz ostry PSTVd-S XIII — były molekularnie heterogenne. Trzy warianty sekwencyjne I2, I3 oraz I4 zostały wykryte w PSTVd-I 818. Natomiast PSTVd-S XIII był złożony z wariantów sekwencyjnych S23, S27, I2, I4. Różnice w sekwencji nukleotydowej tych wariantów sekwencyjnych dotyczą kilku podstawień nukleotydowych w obrębie domeny P i V. Przeprowadzono badania infekcyjności polegające na mechanicznym zakażeniu, poprzez

wcieranie preparatów plazmidowych (inokulum) w liście siewek pomidora odmiany Rutgers i obserwacji rozwijających się objawów porażenia. Badania te wykazały, iż wszystkie warianty molekularne są infekcyjne i indukują symptomy o określonej ostrości, są więc odrębnymi genomami zdolnymi do replikacji w komórkach rośliny gospodarza. Na uwagę zasługuje fakt, że wyjściowy izolat ostry w istocie jest złożony z czterech wariantów sekwencyjnych, wśród których dwa (I2, I4) analizowane osobno są fenotypowo pośrednimi. Mimo występowania różnych fenotypowo wariantów sekwencyjnych w izolacie ostrym PSTVd-SXIII całkowity fenotyp tego izolatu, złożonego z kilku wariantów, pozostaje ostry. Pośrednie objawy wywoływane zapewne przez warianty I2, I3, I4 są zagłuszane przez ostre objawy wywoływane przez obecne w izolacie wersje „ostre”. Jest oczywiste, że wyjściowy izolat jest nie tylko heterogeny molekularnie, ale po prostu zawiera różne wersje genotypu PSTVd. Cecha patogenności jest związana z określoną sekwencją niesioną przez określony wariant i przekazywaną potomnym niciom danego wariantu. Zjawisko heterogenności genetycznej wirusów RNA, a także wiroidów, jest powszechne (EIGEN 1993, VISVADER i SYMONS 1985). Wiąże się je z wysoką zmiennością mutacyjną owych genomów, wynikającą z braku mechanizmów reperujących swoistych dla genów zapisanych w podwójnych niciach DNA.

Tabela 1

Wyniki analizy molekularnej izolatów RNA PSTVd

Wyjściowy izolat PSTVd	Wykryty wariant sekwencyjny	Liczba znalezionych klonów	Objawy wywoływane na porażonych roślinach przez dany wariant sekwencyjny
Ostry PSTVd-SXIII	S23	1	ostre
	S27	1	ostre
	I2	8	pośrednie
	I4	1	pośrednie
Pośredni PSTVd-1818	I2	8	pośrednie
	I3	1	pośrednie
	I4	1	pośrednie
Łagodny PSTVd-M	M	7	łagodne

PATOGENNOŚĆ PSTVd

Wobec tego, że RNA wiroidów nie niesie informacji dotyczącej syntezy swoistych białek przyjmuje się, że patogeny wpływ wiroidowego RNA na roślinę wynika z bezpośredniego oddziaływania tegoż RNA na jakieś składniki komórki gospodarza. Wyszukiwano kilka hipotez dotyczących mechanizmu patogenności wiroidów, ale żadna z nich nie została, do tej pory, potwierdzona w pełni

doświadczalnie. Przypuszczalny udział komórkowej polimerazy II RNA w replikacji wiroidów stał się podstawą do stworzenia hipotezy, według której RNA PSTVd może współzawodniczyć z DNA gospodarza o polimerazę II, zakłócając funkcjonowanie komórek roślinnych (RACKWITZ i współaut. 1981).

Inna hipoteza jest oparta na podobieństwie sekwencji genomu wiroida do sekwencji niskocząsteczkowych jądrowych RNA komórki (snRNA). Proponuje się, że RNA wiroidowy zakłóca proces wycinania intronów z RNA komórkowego. Model zaproponowany przez DICKSON (1981) jest oparty na podobieństwie sekwencji pomiędzy RNA PSTVd w rejonie nukleotydów 306–314 i 112–123 a końcem 5' niskocząsteczkowego jądrowego U1 RNA. W innych modelach (DIENER 1981, GROSS i współaut. 1982) również zwrócono uwagę na podobieństwo sekwencji wiroidów do pierwszorzędowej struktury RNA U1 (snRNA). Tym autorem istotne wydaje się podobieństwo 5' końca U1 RNA i genomu PSTVd pomiędzy 258 i 282 nukleotydem (GROSS i współaut. 1982), lub pomiędzy 257 i 279 nukleotydem (DIENER 1981). Podobnie, sugerowano wpływ wiroidowego RNA na proces składania genów biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji RNA PSTVd do U3 RNA (SCHÜMACHER i współaut. 1983, KISS i współaut. 1983) oraz ASBVd do U5 RNA (KISS i SOLYMOSEY 1982). Słabą stroną powyższych modeli jest to, że różnice sekwencji nukleotydowej pomiędzy różnymi fenotypowo szczepami PSTVd nie występują w obrębie kluczowych dla modeli regionów cząsteczki PSTVd, nie tłumaczą więc różnic w ostrości objawów wywoływanych przez różne szczepy. Istotne wydaje się również to, iż modele te były oparte na porównaniu sekwencji RNA wiroidowego z U-RNA z komórek zwierzęcych a nie roślinnych.

Najbardziej interesująca wydaje się hipoteza wysunięta przez SCHNÖLZER i współpracowników (1985). Podstawą tego modelu jest zauważona korelacja pomiędzy ostrością objawów powodowanych przez różne izolaty PSTVd, a stabilnością termodynamiczną regionu cząsteczki, w którym lokują się różnice w sekwencji pomiędzy tymi izolatami. Region ten, zwany VM (ang. virulence modulating), należy do domeny P i obejmuje fragment RNA pomiędzy 42 i 60 (górny fragment nici struktury pałeczkowatej wiroida) oraz 300 i 319 nukleotydem dolnego fragmentu nici. Porównując cztery różne szczepy PSTVd stwierdzono, że ze wzrostem wirulentności (zjadliwości) maleje stabilność termodynamiczna drugorzędowej struktury RNA regionu VM domeny P. Region ten prawdopodobnie oddziałuje z nieznanym jeszcze czynnikiem komórkowym stanowiącym „tarczę” (ang. target) wiroida w zainfekowanej komórce. Czynnikiem tym może być jeden z rodzajów niskocząsteczkowego RNA 7S RNA, który wchodzi w skład cząsteczki SRP (ang. signal recognition particle), związanej z transportem pewnych białek sekrecyjnych i błonowych przez błony reticulum endoplazmatyczne (HASS i współaut. 1988).

Analiza stabilności termodynamicznej mutantów PSTVd ze zmianami nukleotydowymi wprowadzonymi w obszar domeny P (HAMMOND 1992) oraz różnych naturalnych izolatów PSTVd (GÓRA i współaut. 1994) wykazała, że choć większość z nich zachowuje się zgodnie z regułą SCHNÖLZER, to istnieją też takie, w przypadku których nie ma korelacji pomiędzy patogennością a stabilnością termodynamiczną. Zależności takiej nie stwierdzono również dla łagodnego i ostrego izolatu wiroida łuszczyca kory cytrusów CEVd (VISVADER i SYMONS 1985).

Region VM jest częścią domeny P i eksperymentalnie wykazano, że właśnie sekwencja tej domeny jest kluczowa dla ostrości objawów porażenia. Bezpośredni wpływ tej domeny na patogenność wykazały analizy infekcyjności hybrydowych cząsteczek wiroidów. VISVADER i SYMONS (1986) skonstruowali chimeryczne (rekombinacyjne) cząsteczki wiroida CEVd. Konstrukty z domeną P pochodzącą z izolatu łagodnego wywoływały łagodne objawy chorobowe w porażonych roślinach wskaźnikowych. Natomiast rekombinanty z domeną P pochodzącą z izolatu ostrego powodowały wystąpienie symptomów ostrych lub łagodnych w zależności od stężenia inokulum używanego do zakażenia roślin. Analiza międzygatunkowych rekombinantów (SANO i współaut. 1992) będących połączeniem różnych regionów cząsteczki wiroida pochodzących od CEVd i TASVd (wiroid wierzchołkowej karłowatości pomidorów) potwierdziła wpływ domeny P na wirulentność wiroidów. Wykazano też znaczący wpływ na ostrość symptomów porażenia domeny TL i domen V+TR.

Określenie funkcji domen PSTVd zostało też przeprowadzone w naszym laboratorium. Podstawą tych badań stała się analiza molekularna trzech różnych fenotypowo izolatów PSTVd (tab. 1). Opisane warianty sekwencyjne (tab. 1) wywołujące powstanie objawów porażenia określonego typu, różnią się punktowymi mutacjami zarówno w domenie P oraz V. Biorąc pod uwagę tę obserwację oraz wyniki analizy infekcyjności rekombinacyjnych międzygatunkowych (SANO i współaut. 1992) i wewnątrzgatunkowych (VISVADER i SYMONS 1986) cząsteczek wiroida można sądzić, że wirulentność PSTVd jest określona przez strukturę obu domen (P oraz V) lub przez analogię z innymi wiroidami tylko domenę P. Gdyby drugie przypuszczenie było słuszne, to stwierdzone przez nas mutacje w domenie V nie wpływałyby w znaczący sposób na patogenność. Skonstruowaliśmy więc infekcyjne plazmidy zawierające wstawki hybrydowe (chimery) będące połączeniem połówek cDNA z domenami P i V pochodzącymi z wariantów sekwencyjnych PSTVd różniących się zjadliwością. Domeny P pochodzące z wariantów letalnego (ang. lethal), ostrego (ang. severe) i łagodnego (ang. mild) oznaczyliśmy PL, PS, PM, analogicznie oznaczyliśmy domeny V — VL, VS, VM. Konstrukcje chimer prowadziliśmy posługując się trzema wyjściowymi sekwencjami: molekularnym wariantem PSTVd-M (PM-VM) wywołującym łagodne objawy porażenia oraz wariantami sekwencyjnymi: KF440-2 (PL-VL) i S23 (PS-VS) dającymi objawy ostre. Izolat KF440-2 udostępniony nam przez dr Mina Tsagris, określony przez autora jako letalny, w naszych warunkach laboratoryjnych powoduje wystąpienie objawów chorobowych o takiej samej ostrości, jak wariant S23, choć różni się zmianami nukleotydowymi w domenie P i V. Schemat konstrukcji hybrydowych cząsteczek PSTVd jest przedstawiony na rycinie 3. Różnice w strukturze pierwszorzędowej tych trzech wariantów są zlokalizowane w domenie P oraz V, natomiast pozostałe domeny: C, TL i TR wykazują 100% podobieństwa sekwencji. Łączenie więc ze sobą połówek wiroidowego cDNA różnych wariantów prowadzi w rezultacie do wymiany domeny P lub V pomiędzy tymi wariantami. W ten sposób rozporządzaliśmy pełnym kompletem genomów reprezentującym permutacje obu domen. Przeprowadzone badania infekcyjności otrzymanych wyjściowych i hybrydowych cząsteczek wiroida pozwoliły na określenie bezpośredniego wpływu domeny P i V na patogenność i replikację wiroida. Przykład wyników jednej analizy przedstawiono na rycinie 4. Nasze

wyniki dowodzą, że to struktura domeny P jest bezpośrednio odpowiedzialna za ostrość symptomów porażenia. Sześć typów badanych cząsteczek PSTVd z domeną P „typu ostrego” (PS-VS, PL-VL, PL-VM, PS-VM, PS-VL, PL-VS) indukowało powstanie ostrych objawów porażenia, podczas gdy cząsteczki zawierające domenę P „typu łagodnego” (PM-VM, PM-VL, PM-VS) prawie niezauważalną epinastię. Oznaczyliśmy stężenie wiroida w tkance roślinnej (liść) w różnych odstępach czasowych po inokulacji rekombinacyjnymi plazmidami. Otrzymane wyniki wskazują na brak zależności pomiędzy stężeniem wiroida w roślinie a ostrością objawów porażenia. Nie zaobserwowaliśmy istotnego wpływu domeny V na replikację i zjadliwość PSTVd.

**kontrola****PM-VS****PS-VM**

Ryc. 4. Symptomy porażenia wywoływane przez wybrane genomy PSTVd.

Przedstawione badania hybrydowych cząsteczek wiroida prowadzą do wniosku, że wyodrębnione krótkie obszary genomu RNA — domeny — niosą zapis dotyczący konkretnego fenotypu. Domeny te wykazują ciągłość genetyczną i przeniesione w inny kontekst nie tracą swojej funkcji. Prowadzi to do dość paradoksalnego spostrzeżenia. Wiemy, że PSTVd to genom, koduje on swoją replikację, przemieszczanie się w roślinie i patogenność. Nie wiemy jednak ile ten mini-genom zawiera genów. Nie potrafimy tu bowiem zastosować standardowej definicji genu. Nie możemy w przypadku PSTVd mówić o genie jako cistronie, bowiem PSTVd nie koduje białek. Nie możemy tu mówić o genie jako jednostce komplementującej, ekspresja genetyczna wiroida wydaje się zachodzić w cis, nie obserwuje się komplementacji w trans. Pozostaje nam spostrzeżenie, że poszczególne krótkie domeny (P, C, V czy T) wiroidowego RNA określają swoiste fenotypy. W sumie myśląc o tym mini-genomie RNA, pewnie trzeba używać

pojęcia „mini-genów”, odpowiadających krótkim sekwencjom RNA (kilku- kilkunastu nukleotydowych) określającym dane funkcje.

Mimo bardzo dokładnego poznania struktury RNA wiroidów, molekularny mechanizm ich namnażania się, czy też patogenności pozostaje wciąż nie rozwiązana zagadką.

STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE POTATO SPINDLE TUBER VIROID

Summary

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) was the first member of this peculiar group of plant pathogenic agents, the viroids, to be characterized. It was also the first pathogenic agent to be completely sequenced and for which infectious cDNA molecules became available. This single stranded, circular RNA molecule (356–360 nucleotide long) is an autonomous replicon which induces specific symptoms in its host plants while completely lacking, at the same time, the polypeptide coding capacity. Therefore, any information necessary for viroid replication and pathogenicity has to be carried by the RNA sequence itself and/or by the resulting viroid secondary structure.

Based on sequence comparison analysis the generalized rod-like viroid structure has been divided into five domains: the central conserved region (CCR, domain C), the pathogenicity domain (P), the variable domain (V), the right terminal (TR), and the left (TL) terminal loops.

The various sequenced PSTVd isolates which induced different symptoms (mild, intermediate, severe, and lethal) in infected plants differ mostly in the P domain sequences, but mutations are also detected in the V domain. The relative contributions of the V and P domains to PSTVd pathogenicity have been investigated by analysing the disease's phenotypes induced by PSTVd chimeric recombinants. In PSTVd the P domain structure is directly responsible for the severity of symptoms induced in tomato.

LITERATURA

- BRANCH A. D., BENENFELD B. J., ROBERTSON H. D. 1988. *Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9128–9132.
- CANDRESSE T., DIENER T. O., OWENS R. A. 1990. *The role of the viroid central conserved region in cDNA infectivity*. Virology 175, 232–237.
- DICKSON E., 1981. *A model for the involvement of viroids in RNA splicing*. Virology 115, 216–221.
- DIENER T. O., 1979. *Viroids and viroid diseases*. Wiley and Sons, New York.
- DIENER T. O., 1981. *Are viroids escaped introns?* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5014–5015.
- DIENER T. O., 1986. *Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 58–62.
- DIENER T. O., 1987. *The viroids*. Plenum, New York.
- EIGEN M., 1993. *The origin of genetic information: viruses as models*. Gene 135, 37–47.
- GÓRA A., CANDRESSE T., ZAGÓRSKI W., 1994. *Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates*. Arch. Virol. 138, 233–245.
- GROSS H. J., DOMDEY H., LOSSOW C., JANK P., RABA M., ALBERTY H., SÄNGER H. L., 1978. *Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid*. Nature 273, 203–208.
- GROSS H. J., LIEBEL U., ALBERTY H., KRUPP G., DOMDEY H., RAMM K., SÄNGER H. L., 1981. *A severe and mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only*. Biosci. Rep. 1, 235–241.
- GROSS H. J., KRUPP G., DOMDEY H., RABA M., JANK P., LOSSOW C., ALBERTY H., RAMM K., SÄNGER H. L. 1982. *Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid*. Eur. J. Bich. 121, 249–257.
- HAMMOND R. W., 1992. *Analysis of the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis*. Virology 187, 654–662.

- HASS B., KLANNER A., RAMM K., SÄNGER H. L., 1988. *The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementarity to viroids.* EMBO J. 7, 4063-4074.
- HENCO K., SÄNGER H. L., RIESNER D., 1979. *Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods.* Nucleic Acids Res. 6, 3041-3059.
- HEROLD T., HASS B., SINGH R. P., BOUCHER A., SÄNGER H. L., 1992. *Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids.* Plant. Mol. Biol. 19, 329-333.
- KEESE P., SYMONS R. H., 1985. *Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4582-4586.
- KISS T., POSFAI J., SOLYMOSEY F., 1983. *Sequence homology between potato spindle tuber viroid and U3 snRNA.* FEBS Lett. 163, 217-220.
- KISS T., SOLYMOSEY F., 1982. *Sequence homologies between a viroid and small nuclear RNA (sn RNA) species of mammalian origin.* FEBS Lett. 144, 318-320.
- KOWALSKA-NOORDAM A., CHRZANOWSKA M., SKRZECZKOWSKA S., 1986/1987. *Reaction of ten Polish potato cultivars to severe and mild strains of potato spindle tuber viroid.* The Potato, 71-91.
- LAKSHMAN D. K., TAVANTZIS S. M., 1993. *Primary and secondary structure of 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid.* Arch. Virol. 128, 319-331.
- LOSS P., SCHMITZ M., STEGER G., RIESNER D., 1991. *Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA.* EMBO J. 10, 719-727.
- PFANNENSTIEL M. A., SLACK S. A. 1980. *Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid.* Phytopathology 70, 922-926.
- RACKWITZ H. R., ROHDE W., SÄNGER H. L., 1981. *DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies.* Nature 291, 297-301.
- RIESNER D., HENCO K., ROKHL U., KLOTZ G., Kleinschmidt A. K., GROSS H. J. Domdey H., Sängner H. L. 1979. *Structure and structure formation of viroids.* J. Mol Biol. 133, 237-251
- RIESNER D., GROSS H. J., 1985. *Viroids.* Annu. Rev. Biochem. 54, 531-564.
- SANO T., CANDRESSE T., HAMMOND R. W., DIENER T. O., Owenss R. A. 1992. *Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 10104-10108.
- SCHINDLER I. M., MÜHLBACH H. P., 1992. *Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerase in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation.* Plant Science 84, 221-229
- SCHNÖLZER M., HASS B., RAMM K., HOFMANN H., SÄNGER H. L., 1985. *Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd).* EMBO J. 4, 2181-2190.
- SCHUMACHER J., SÄNGER H. L. RIESNER D., 1983. *Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue.* EMBO J. 2, 1549-1555.
- SEMANCIK J. S., 1987. *Viroids and viroid-like pathogens.* CRC Press, Boca.
- SYMONS R. H., 1991. *The intriguing viroids and virusoids: what is their information content and how did they evolve?* Mol. Plant-microbe Interactions 4, 111-121
- TABLER M., SÄNGER H. L., 1984. *Cloned single- and double-stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTVd) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious.* EMBO J. 3, 3055-3062.
- VISVADER J. E., SYMONS R. H., 1985. *Eleven new sequence variants of the citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity.* Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920.
- VISVADER J. E., SYMONS R. H., 1986. *Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus excortis viroid.* EMBO J. 5, 2051-2055.