

ویروئیدها: بیماری‌زایی و تغییر در رونوشت‌ها و پروتئوم میزبان

Viroids; pathogenicity and changes in the host proteome and transcriptome

فهیمة امیرنیا، محمد حاجی‌زاده*

Fahimeh Amirnia, Mohammad Hajizadeh

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan,
Sanandaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.hajizadeh@uok.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۹/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۲)

چکیده

واژه‌های کلیدی

به دلیل اندازه کوچک ویروئیدها (۲۴۶ تا ۴۳۶ نوکلئوتید)، عدم توانایی در تولید پروتئین و ایجاد برخی از بیماری‌ها با شدت بالا، "مکانیسم بیماری‌زایی ویروئیدها در میزبان" یکی از جنبه‌های جذاب مطالعه آن‌ها به‌شمار می‌رود. تعاملات مستقیم و غیرمستقیم ویروئیدها با فاکتورهای میزبانی در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است که منجر به تغییر در پروتئوم، رونوشت‌های میزبان و در نتیجه بیماری در گیاهان شده است. آخرین مدل ارائه شده برای چنین تغییراتی، مکانیسم خاموشی RNA می‌باشد که اکنون در هر دو خانواده ویروئیدی مورد تأیید قرار گرفته است. در این مقاله مروری، سعی بر این است که آخرین مطالعات در این زمینه مورد بحث قرار گیرد.

اوسان ویروئیده،

پوسپی ویروئیده،

تغییرات بیوشیمیایی،

خاموشی ژن،

فاکتورهای میزبانی

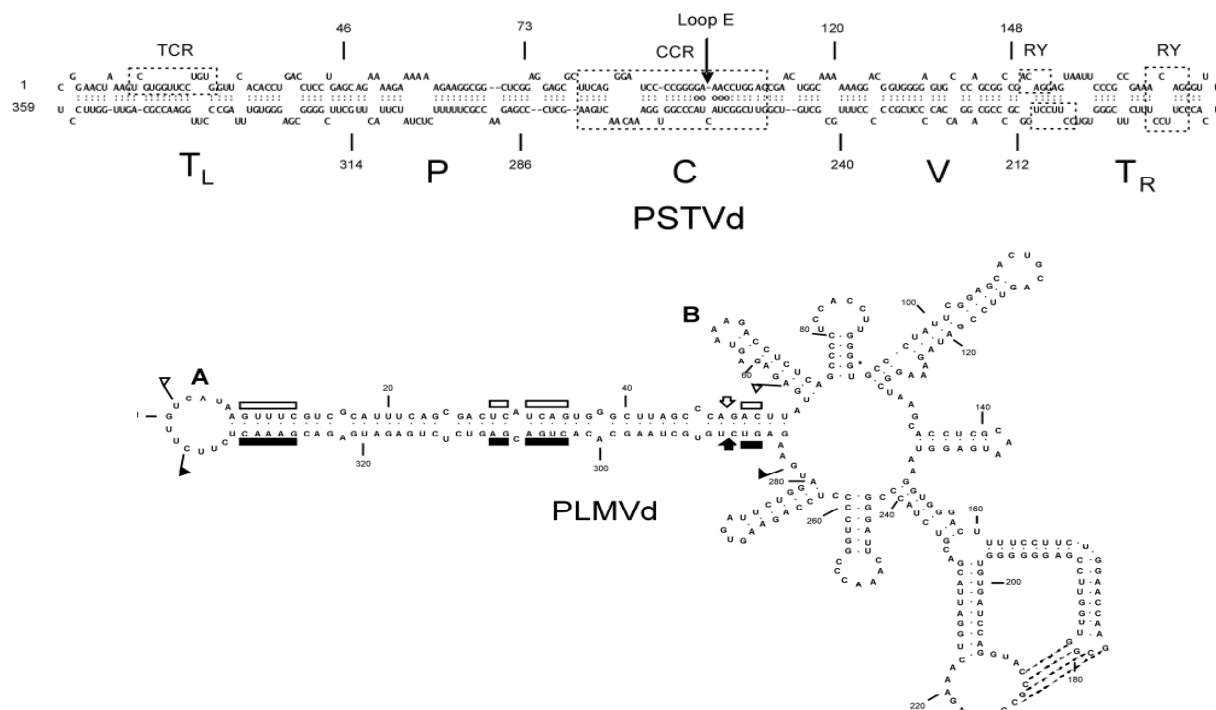
ویروئیدها کوچکترین و ساده‌ترین بیمارگرهای گیاهی به طول ۲۴۶ تا ۴۳۶ نوکلئوتید هستند که ژنوم آن‌ها از یک RNA تک رشته‌ای و حلقوی با ساختار ثانویه مشخص تشکیل شده است (Sanger et al. 1976). ویروئیدها برخلاف ویروس‌ها غیرکدکننده هستند و برای تکمیل چرخه بیماری‌زایی خود به فاکتورهای میزبانی وابسته هستند (Diener, 2001). تاکنون بیش از ۳۰ گونه ویروئید شناسایی شده‌اند که بر اساس واحدهای ساختاری و ویژگی‌های بیولوژیکی از جمله مکان تکثیر و تجمع در سلول میزبان در دو خانواده *Pospiviroidae* و *Avsunviroidae* قرار گرفته‌اند (Di Serio et al. 2017). مطابق شکل ۱، ساختار شبه میله‌ای خانواده *Pospiviroidae* از پنج دومین مشخص به نام‌های ناحیه حفاظت شده مرکزی (Central Conserved Region)، بیماری‌زایی (Pathogenicity)، متغیر (Variable)، ناحیه چپ و راست انتهایی (Terminal left and right) تشکیل شده است (Keese and Symons, 1985). طبقه‌بندی ویروئیدها در این خانواده بر اساس شباهت توالی نوکلئوتیدی، وجود یا عدم وجود نواحی CCR، ناحیه حفاظت شده انتهایی (Terminal conserved region, TCR) و ناحیه سنجاک سر حفاظت شده انتهایی (Terminal conserved hairpin, TCH) صورت می‌گیرد (Flores et al. 2005). همچنین تشخیص گونه‌های ویروئیدی این خانواده بر اساس تشابه بیش از ۹۰ درصد توالی نوکلئوتیدی همراه با خصوصیات بیولوژیکی، ویژگی‌های میزبان، علائم و بیماری‌زایی انجام می‌شود (Di Serio et al. 2014). خانواده *Avsunviroidae* فاقد ناحیه‌های حفاظت شده CCR، TCR و TCH می‌باشد اما هر دو طرف رشته دارای ساختار رایبوزیم سرچکشی (Hammerhead ribozyme) هستند که به‌طور خودکار الگومرهای ساخته شده را به واحدهای مونومر برش می‌دهند (Flores et al. 2005). با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد ویروئیدها به‌ویژه فعالیت خودبرشی خانواده *Avsunviroidae* از نظر منشا تکاملی، مستقل از ویروس‌ها و به عنوان نماینده بقای RNA در جهان هستند (Flores et al. 2020). این بیمارگر خسارت اقتصادی قابل توجهی به تعدادی از گیاهان از جمله سیب‌زمینی (Hammond, 1994)، گل داودی (Zhao et al.

(Hajizadeh et al. 2015)، رازک (Gucek et al. 2019)، انگور (Lin et al. 2012)، درختان دانه‌دار مثل سیب (Wang et al. 2009) و مرکبات (Faggioli et al. 1997) و مرکبات (Wang et al. 2009) وارد می‌کند. از نظر نحوه انتقال اغلب به صورت مکانیکی، تکثیر اندام‌های رویشی میزبان آلوده، تعدادی کمی توسط بذر یا دانه گرده و گزارش‌های محدودی از انتقال بعضی ویروئیدها با ناقل مانند ویروئید *Tomato planta macho viroid* در تماس شته با میزبان آلوده (Flores et al. 2005)، *Apple scar*، *skin viroid* به کمک مگس سفید (Walia et al. 2015) و *Tomato apical stunt viroid* توسط برخی زنبورها (Antignus et al. 2007) شده است. با توجه به مستقل بودن و احتمالاً قدمت بیشتر ویروئیدها نسبت به ویروس‌ها هنوز به صورت یک معما باقی مانده است که چرا گیاهان به عنوان تنها میزبان این پاتوژن در طبیعت شناخته شده‌اند هر چند در یک بررسی اخیر، آلودگی سه گونه ویروئید در قارچ‌های رشته‌ای مختلف، کاهش رشد و بیماری‌زایی آنها در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است و پتانسیل آنها در گسترش به سایر ارگانیسم‌ها را در طبیعت نشان می‌دهد (Wei et al. 2019).

نحوه ایجاد بیماری توسط ویروئیدها در گیاهان

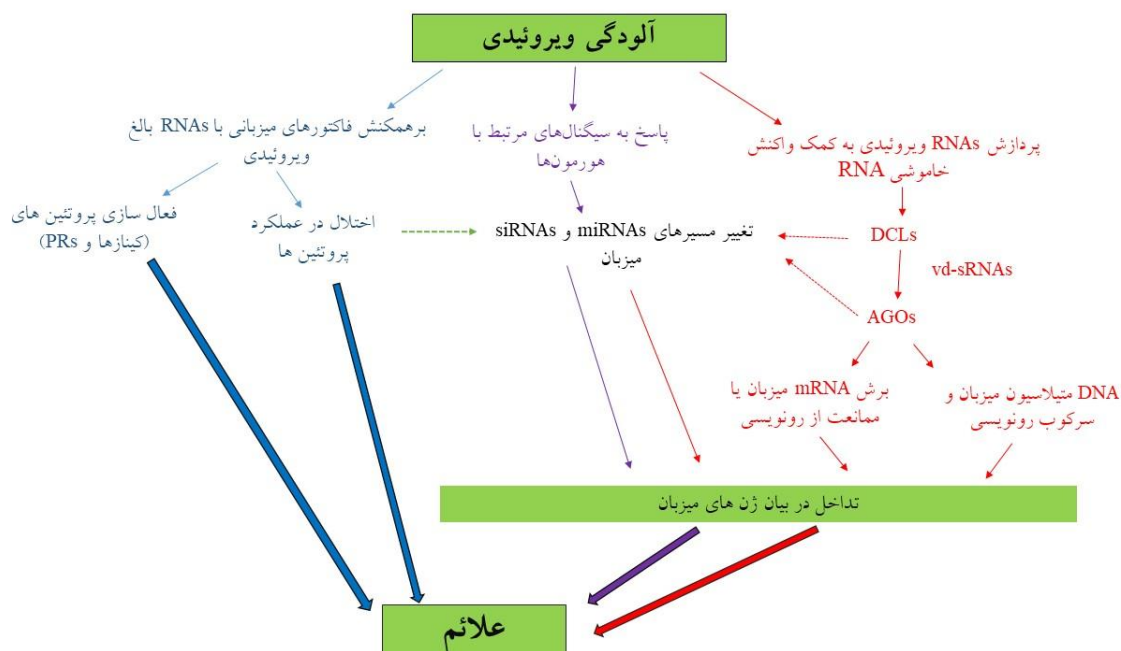
بعد از اولین توالی‌یابی ویروئیدها، مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی آن‌ها به دو صورت مطرح شد (Flores et al. 2017).

برهمکنش مستقیم ویروئیدها با میزبان: همان‌طور که اشاره شد ویروئیدها به دلیل عدم توانایی تولید پروتئین و نیاز به آنزیم‌های میزبان جهت تکثیر، می‌توانند اثر بیماری‌زایی خود را از طریق تعامل مستقیم (ویروئید یا مکمل آن) با فاکتورهای میزبانی اعمال کنند (Flores et al. 1997). به طور مثال، همانندسازی ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) توسط RNA پلی‌مراز II در هسته انجام می‌شود که در فرم ویرایش‌یافته منحصر به فرد آن، فاکتور رونویسی (TFIIIA-7ZF) IIIA دخالت دارد که نقش PSTVd در برهمکنش با تنظیم‌کننده ویرایش TFIIIA (پروتئین ریپوزومی L5 (RPL5)) در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی به اثبات رسیده است (Jiang et al. 2018).



شکل ۱- ساختار ثانویه گونه‌های تیپ مربوط به دو خانواده (برگرفته از Owens and Hammond, 2009)

Figure 1. Secondary structures of the type members of the two families of viroids (Owens and Hammond, 2009)



شکل ۲- تغییرات بیوشیمیایی حاصل از برهمکنش ویروئیدها با میزبان که باعث ایجاد علائم میکروسکوپی می‌شوند (برگرفته از Navarro et al. 2012a)

Figure 2. Potential pathways connecting the first viroid-host interaction that through one or more cross-talking signaling cascades ultimately lead to the macroscopic symptoms (Navarro et al. 2012a)

فاقد علائم، علائم خفیف و یا شدید ایجاد کنند (Gago-Zachert et al. 2016). به طور مثال جایگزین کردن نوکلئوتید U با A در موقعیت ۲۵۷ ناحیه CCR جدایه PSTVd، باعث کاهش شدید

همچنین در طول آلودگی میزبان توسط جدایه‌های مختلف یک ویروئید، علائم متفاوتی در میزبان ایجاد می‌شود که شدت علائم بستگی به تعامل بین ویروئید و فاکتورهای میزبان دارد که می‌تواند

اختلال در عملکرد پروتئین‌ها: به دلیل عدم تولید پروتئین توسط ویروئیدها، چرخه آلودگی ویروئیدها وابسته به پروتئین‌های میزبان می‌باشد که در عملکرد طبیعی آن‌ها تداخل ایجاد می‌کنند (جدول ۱). بنابراین شناسایی آنزیم‌های میزبانی درگیر در همانندسازی ویروئیدها، شناسایی پروتئین‌های میزبانی که نقش حفاظت از ژنوم حلقوی ویروئیدها و تسهیل حرکت ویروئید در سرتاسر میزبان را بر عهده دارند و همچنین رابطه بین اپی ژنتیک میزبان با ویروئیدها ضروری است (Di Serio et al. 2013; Ding and Itaya 2007).

آغاز فعالیت پروتئین‌ها یا القاء آن‌ها (پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و کینازها): پس از آلودگی‌های ویروئیدی، بیان ژن‌های میزبان در دو سطح رونویسی (Transcriptional) و پس از رونویسی (Post-transcriptional) بررسی شده است که منجر به افزایش رونویسی ژن‌های مربوط به استرس و دفاع مانند پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs) (PR1a, PR1b, β -1, 3-glucanases (و غیره) می‌شوند که مشابه پاسخ گیاه به هنگام آلودگی به باکتری، قارچ و ویروس می‌باشد (Owens and Hammond, 2009). به طور مثال، آلودگی گوجه‌فرنگی به PSTVd باعث افزایش رونویسی ژن پروتئین کیناز سرین-ترئونین (pkv) می‌شود. این پروتئین نقش بیولوژیکی در رشد گیاهان دارد و بیان بیش از حد آن در تنباکو باعث اختلال در تشکیل ریشه و رشد می‌شود که مشابه علائم آلودگی PSTVd در گوجه‌فرنگی است (Hammond and Zhao, 2009).

اختلال در سیگنال‌های مرتبط با هورمون‌ها

بسیاری از علائم ویروئیدی مانند کوتولگی و روخمش با اختلال در متابولیسم هورمون‌ها همراه است (Diener, 1987). به طور مثال، آلودگی مرکبات به ویروئید اگزوکورتیس مرکبات (*Citrus exocortis viroid*) (Martin et al. 2007) و خیار به ویروئید کوتولگی رازک که باعث کاهش سطح جیبرلین و در نتیجه کاهش رشد گیاهان آلوده می‌شود (Yaguchi and Takahashi, 1985). از تداخل در مسیر سایر هورمون‌ها می‌توان افزایش سطح جنتیسیک اسید (Gentisic acid) (Flores et al. 2017) و افزایش بیان اتیلن در گوجه‌فرنگی آلوده به

اندازه گیاه، سطح رونوشت‌های LeExp2 (دارای نقش در رشد سریع هیپوکوتیل‌ها، ساقه‌ها و برگ‌ها) و در نهایت منجر به مرگ گیاه آلوده می‌شود در حالی‌که، جایگزین کردن U_{257} با C و G علائم شدید ایجاد نمی‌کند (Qi and Ding, 2003). علائم کاکسیا در مرکبات با تغییر شش نوکلئوتید در ناحیه متغیر ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*) ایجاد می‌شود (Reanwarakornt and Semancik, 1999). آلودگی شدید توسط ویروئید کادانگ نارگیل (*Coconut cadang-cadang viroid*) با ایجاد یک یا دو جهش در سه موقعیت در نواحی بیماری‌زایی (Pathogenicity) و CCR (Randles et al. 1988) و کاهش شدت علائم ویروئید لکه آفتابی آووکادو (*Avocado sunblotch viroid*) (ASBV) با ایجاد جهش در لوپ انتهای راست (Terminal right) به وجود می‌آید (Semancik and Szychowski, 1994). به نظر می‌رسد هر کدام از این تغییرات ممکن است باعث تغییر در برهمکنش ویروئید با فاکتور میزبانی شده و از این طریق روی نوع علائم و شدت آن تأثیرگذار هستند.

برهمکنش غیرمستقیم ویروئیدها با میزبان: در برهمکنش غیرمستقیم، ویروئید از طریق RNAs کوچک مشتق شده ویروئیدی (vd-siRNAs) حاصل از مسیرهای شبیه به خاموش RNA (RNA Silencing) با میزبان تعامل برقرار می‌کند (Flores et al. 2017) که در بخش خاموش RNA بحث خواهد شد.

تغییرات بیوشیمیایی حاصل از برهمکنش ویروئیدها با میزبان

مطابق شکل ۲، ویروئیدها از طریق سه مسیر، شامل: ۱- برهمکنش فاکتورهای میزبانی با RNAs بالغ ویروئیدی ۲- پاسخ به سیگنال‌های مرتبط با هورمون‌ها ۳- پردازش RNAs ویروئیدی به کمک واکنش خاموشی RNA، با میزبان ارتباط برقرار می‌کنند که هر سه مسیر در نهایت باعث علائم میکروسکوپی می‌شوند (Navarro et al. 2012a).

برهمکنش فاکتورهای میزبانی و RNAs ویروئیدی بالغ: این برهمکنش در عملکرد پروتئین‌های میزبانی مرتبط با ویروئیدها اختلال ایجاد می‌کنند و یا پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی فعال می‌شوند (Navarro et al. 2012a).

براسینواستروئید در گیاهان ایجاد کند (Owens *et al.* 2012). اختلال در عملکرد پروتئین‌های میزبان و مسیرهای سنتز هورمون-ها باعث تغییر در مسیر miRNAs و siRNAs میزبان می‌شود که در نهایت با ظهور علائم در میزبان همراه است (Navarro *et al.* 2012a).

CEVd (Vazquez Prol *et al.* 2020) و کاهش سطح اسیدآلفا در انگور آلوده به ویروئید کوتولگی رازک (Flores *et al.* 2017) نام برد. همچنین PSTVd برخلاف اینکه در سنتز اکسین بی‌تاثیر است ولی می‌تواند تغییرات قابل توجهی در سطح رونوشت‌های بیوستتر اتیلن، جیبرلین، آبسزیک‌اسید، جاسمونیک‌اسید، سیتوکین و

جدول ۱- مثال‌هایی از اختلال در عملکرد پروتئین‌ها توسط ویروئیدها

Table 1. Examples of host proteins irregularity by viroids

ویروئید	فاکتور میزبانی	نقش در میزبان	نتیجه برهمکنش	منبع
PSTVd	Virp1 (Viroid RNA-Binding Protein 1)	تنظیم‌کننده رونویسی مرتبط با تغییرات کروماتین	حرکت سیستمیک و همانندسازی RNA ویروئیدی در توتون و گوجه‌فرنگی	(Alba <i>et al.</i> 2003; Maniataki <i>et al.</i> 2003; Gozmanova <i>et al.</i> 2003; Kalantidis <i>et al.</i> 2007)
PSTVd	RNA پلی مرز II جوانه‌گندم، هیستون‌ها و پروتئین‌های ناشناخته هسته	تکثیر ژنوم	رونویسی RNA ویروئیدی	(Bojic <i>et al.</i> 2012; Itaya <i>et al.</i> 2002; Wolff <i>et al.</i> 1985)
ASBVd	PARBP33 و PARBP35	پایداری، بلوغ و ویرایش رونوشت‌های کلروپلاستی	نقش حامل، تسهیل فعالیت کاتالیزوری ریبوزوم‌های سرچکشی و افزایش خودبرشی رونوشت‌های ویروئید و تکثیر آن‌ها	(Daros and Flores, 2002)
HSVd	CsPP2 (Cucumber Phloem Protein 2)	شناسایی مولکول‌های خارج سلولی و داخل سلولی	حرکت سیستمیک مولکول‌های ویروئیدی در گیاهان آلوده	(Gomez and Pallas, 2001)
PLMVd	Elongation Factor 1 alpha (eEF1A)	تکثیر و ترجمه RNAs و انتقال پروتئین‌های هسته‌ای	احتمالاً دخیل در همانندسازی RNA ویروئیدی	(Dube <i>et al.</i> 2009)

خاموشی با اتصال Green Fluorescence Protein (GFP) به توالی PSTVd، مشاهده تکثیر ویروئید در گوجه‌فرنگی آلوده و در نهایت مقاومت در برابر مکانیسم خاموشی RNA به دلیل داشتن ساختار ثانویه ویروئیدها مورد تایید قرار گرفته است (Itaya *et al.* 2007). ویروئیدها با عملکردی شبیه به فعالیت ژن TAS (Trans-acting siRNA) به دو روش عمل می‌کنند: (الف) سرکوب رونویسی همراه با متیلاسیون DNA از ناحیه پرموتور که در این روش با تکثیر ویروئید در گیاه تراریخته، متیلاسیون بسته به ویروئید در ناحیه خاصی از DNA مکمل ویروئید صورت می‌گیرد که با تغییر در تولید مقدار RNA ریبوزومی (rRNA) میزبان همراه است. به عنوان مثال، آلودگی گیاهان خیار و تنباکو با ویروئید کوتولگی رازک باعث تجمع RNA ریبوزومی (rRNA)

فعل و انفعالات بیماری‌زایی ویروئیدها و واکنش خاموشی RNA میزبان (RNA silencing)

ویروئیدها با وجود ساده بودن نسبت به سایر پاتوژن‌های گیاهی و عدم تولید پروتئین، اطلاعات ژنتیکی کافی برای ایجاد بیماری را دارند (Gomez *et al.* 2009). خاموشی RNA، از اکثر یوکاریوت-ها به‌ویژه گیاهان، در برابر اسیدنوکلئیک‌های خارجی (ویروس‌ها و تراژن‌ها) و داخلی (ترانسپوزون‌ها) محافظت می‌کند (Navarro *et al.* 2012a). تجمع RNAهای کوچک ۲۱ تا ۲۴ نوکلئوتیدی مشتق شده از RNA ویروئیدی (vd-siRNAs) در هر دو خانواده *Avsunviroidae* و *Pospiviroidae* نشان‌دهنده شروع مکانیسم خاموشی RNA در اثر آلودگی ویروئیدی می‌باشد (Flores *et al.* 2020; Pray, 2004). فعالیت تجربی ویروئیدها در برابر مکانیسم

RNAs الیگومری مثبت در هسته به مونومرهای حلقوی به کمک RNaseIII تبدیل می‌شوند (Gago-Zachert et al. 2016). مونومرهای تک رشته‌ای تولید شده در ناحیه 5' و 3' به ترتیب فاقد کلاهک و دم پلی A هستند که با تجمع در نوکلئوپلاسم به عنوان الگوهای برای RDR6 عمل می‌کنند. RDR6 همراه با SGS3 باعث تولید dsRNAs ویروئیدی می‌شوند (Gomez et al. 2009). dsRNAs به عنوان الگوی مولکولی مرتبط با پاتوژن (Pathogen Associated Molecular Pattern) توسط مکانیسم خاموشی RNA شناسایی می‌شود که باعث فعال شدن سیستم دفاعی میزبان در پاسخ به این اسیدنوکلئیک‌های خارجی می‌شود (Gago-Zachert et al. 2016). dsRNAs شناسایی شده به کمک دایسر (DCL4) به قطعات کوچک ۲۱ نوکلئوتیدی ویروئیدی (vd ta-siRNAs) تبدیل می‌شوند که انتهای 3' آن‌ها توسط Hua Enhancer 1 (HEN1) متیله می‌شود تا از تجزیه vd ta-siRNAs توسط آنزیم‌ها جلوگیری شود (Axtell, 2013). با حذف یکی از دو رشته vd ta-siRNAs در سیتوپلاسم، رشته باقی مانده به کمک Argonaute (AGO) proteins ۱ یا ۷، (RISC) RNA-induced silencing complexes را تشکیل می‌دهند که در نهایت mRNAs میزبان را برش و باعث ظهور علائم در میزبان می‌شوند (Gomez et al. 2009).

ویروس‌ها با تولید سرکوب‌کننده‌های خاموشی ژن RNA silencing suppressor و اتصال به dsRNAs، siRNAs، DCL (جهت ممانعت از اتصال به siRNAs) و یا پروتئین‌های آرگونات (جلوگیری از فعالیت مجدد ژنوم ویروسی) (Csorba et al. 2009) سیستم دفاعی میزبان را سرکوب یا تضعیف می‌کنند. در ویروئیدها بخاطر عدم تولید پروتئین و همچنین ردیابی آن‌ها در هسته و سیتوپلاسم (Gago-Zachert et al. 2016)، فرضیه‌هایی جهت سرکوب خاموشی RNA ارائه شده است: (الف) علائم بیماری در نتیجه هدف قرار دادن تصادفی mRNAs میزبان توسط vd-siRNAs در جهت غیرفعال‌سازی ژن‌های میزبان و گسترش بیماری انجام می‌شود (Gomez et al. 2009) (ب) با ردیابی vd-siRNAs در سیتوپلاسم گیاهان آلوده به PSTVd (تکثیر و تجمع در هسته)، ویروئیدها از RNA-induced silencing complexes فرارکنند (ج) ویروئیدها به دلیل عدم توانایی تولید پروتئین که

در میزبان آلوده و کاهش متیلاسیون سیتوزین در ناحیه rDNA پروموتور می‌شود (Castellano et al. 2016). (ب) تنظیمات پس از رونویسی توسط dsRNAs یا Single-stranded (SS) RNA بسیار ساختار یافته که با کمک پروتئین RNases of class III (Dicer-like) به 21-22 nt microRNAs (21, 22 and 24 nt) interfering RNAs تبدیل می‌شوند، سبب تداخل در مسیر خاموشی RNA در میزبان می‌شوند (Flores et al. 2020). در نتیجه، vd-siRNAs به عنوان miRNAs عمل می‌کنند تا بیان ژن‌های فیزیولوژیکی میزبان و علائم مرتبط با بیماری‌زایی را تنظیم کنند (Wang et al. 2004).

با بیان شباهت‌های چرخه زندگی *Pospiviroidae* با Ta-siRNA پیش از حیات (حضور در خزه *Pyscomitrella patens*) و TAS ژن‌های همولوگ گونه‌های تک لپه‌ای و دولپه‌ای) به تشریح چگونگی تداخل ویروئیدها در خاموشی RNA پرداخته خواهد شد (Gomez et al. 2009).

Ta-siRNAs پیش از حیات مثل ژن TAS به کمک RNA پلی‌مراز II رونویسی می‌شوند که به عنوان پیش‌سازهای تولید ta-siRNA عمل می‌کنند سپس، پیش‌سازهای ta-siRNAs رونویسی شده در هسته به کمک RDR6 و همراه با آنزیم کوفاکتور سرکوب‌کننده خاموشی ژن ۳ (Suppressor of Gene Silencing 3, SGS3) منجر به تولید dsRNAs می‌شوند که این dsRNAs توسط دایسر (DCL4) به قطعات کوچک ۲۱ نوکلئوتیدی (ta-siRNAs) تبدیل می‌شوند که انتهای 3' آن‌ها توسط Hua Enhancer 1 (HEN1) متیله می‌شوند. ta-siRNAs ۲۱ نوکلئوتیدی که در نقش miRNAs عمل می‌کنند به سیتوپلاسم منتقل می‌شوند و با اختلال در مرحله پس از رونویسی و برش mRNAs هدف میزبان منجر به ایجاد علائم در گیاه میزبان می‌شوند.

مطابق جدول ۲، زیست‌شناسی ta-siRNA پیش از حیات و پروسه تکثیر تعدادی از اعضای خانواده *Pospiviroidae* به دلیل شباهت‌های زیادی که با هم دارند به احتمال زیادی از نظر ساز و کار خاموشی هم مشابه هستند بنابراین، پیش‌بینی می‌شود در *Pospiviroidae* ابتدا تکثیر RNAs الیگومری مثبت توسط RNA پلی‌مراز II از RNAs الیگومری مکمل انجام می‌شود و سپس

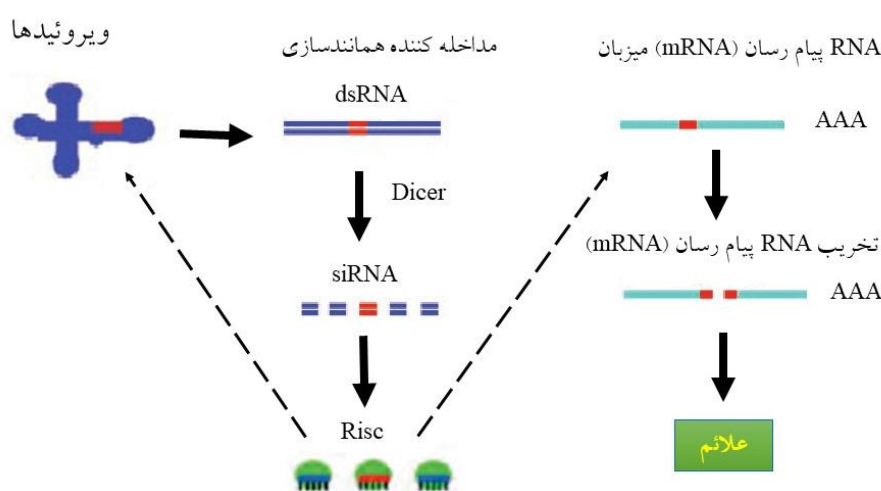
(2016). مطابق شکل ۳ تداخل در مسیر سیگنالی هورمون‌ها و مکانیسم خاموشی RNA توسط ویروئیدها باعث تداخل در بیان ژن‌های میزبان می‌شوند (Navarro et al. 2012a).

برای حرکت نیاز به اتصال به پروتئین‌های میزبان دارند و همچنین با داشتن ساختار ثانویه فشرده در حالت دو رشته‌ای، سیستم خاموشی RNA را سرکوب می‌کنند. Gago-Zachert et al.

جدول ۲- شباهت بین چرخه زندگی *Pospiviroidae* با فعالیت ژن TAS (Trans-acting siRNA) پیش از حیات (برگرفته از Gomez et al. 2009)

Table 2. Similarities between ta-siRNA biogenesis and *Pospiviroidae* life cycle (Gomez et al. 2009)

پیش از حیات Ta-siRNA	<i>Pospiviroidae</i> چرخه زندگی
اولیه Ta-siRNA	واسطه‌های دخیل در تولید رشته مثبت <i>Pospiviroidae</i>
رونویسی ژن‌های اختصاصی TAS توسط RNA پلی‌مراز II	رونویسی رشته مکمل توسط RNA پلی‌مراز II
حضور در هسته، RNA تک رشته‌ای غیر کد کننده	حضور در هسته، RNA تک رشته‌ای غیر کد کننده
دارای جایگاه‌های اختصاصی اتصال به برش miRNA راهنما برای تولید RNAs بیشتر در جهت تولید dsRNAs و ta-siRNAs بالغ	عوامل همانندسازی، RNAs مونومر خطی را در مناطق خاصی برش می‌دهند، تولید RNAs بیشتر در جهت تولید dsRNAs و ta-siRNAs بالغ
Ta-siRNA اولیه توسط RDR6 تشکیل dsRNAs می‌دهند	علائم HSVd در <i>N. benthamiana</i> وابسته به خاموشی RNA با کمک RDR6
به‌کارگیری RDR6 برای رونویسی pre-ta-siRNA که ممکن است به دلیل فقدان cap در ناحیه 5' و دم پلی A در ناحیه 3' باشد	رشته مثبت مونومر فاقد cap در ناحیه 5' و دم پلی A در ناحیه 3'
balg ta-siRNAs	vd-sRNAs
عمدتاً در سیتوپلاسم فعال هستند	PSTVd siRNAs در سیتوپلاسم تجمع پیدا می‌کنند
برش رونوشت‌های درون سلولی غیرهمسان	در مدل بیماری‌زایی به کمک خاموشی RNA، vd-siRNAs راهنما رونوشت‌های با میزان بالای همولوگ میزبان را برش می‌دهند
ta-siRNAs در تنظیم رونوشت‌های درگیر در رشد گیاهان و توسعه گیاهان نقش دارند	آلودگی‌های ویروئیدی به عنوان بیماری‌های رشدی تلقی می‌شوند که شایع‌ترین علائم آن کاهش رشد، تغییر در شکوفه‌دهی و توسعه گیاهان



شکل ۳- مدل پیشنهادی برای مسیر خاموشی ژن در گیاهان میزبان توسط ویروئیدها (برگرفته از Pray, 2004)

Figure 3. The proposed model for gene silencing pathway in host plants by viroids (Pray, 2004)

به طور مثال، انتقال جدایه‌هایی با علائم متفاوت PSTVd به گوجه‌فرنگی باعث تغییر در بیان ژن‌های عمومی یا اختصاصی (ژن‌های دخیل در پاسخ دفاعی، ساختار دیواره سلولی، عملکرد کلروپلاست، متابولیسم پروتئین‌ها و سایر فعالیت‌ها) میزبان می‌شود. احتمالاً اختلاف زمانی در تغییر بیان ژن‌های عمومی گیاهان آلوده به جدایه‌هایی با علائم متفاوت PSTVd به دلیل سرعت متفاوت حرکت سیستمیک این جدایه‌ها یا توانایی‌های متفاوت آن‌ها برای تحریک پاسخ میزبان می‌باشد (Itaya et al. 2002). بنابراین ویروئیدها، اگرچه از نظر ساختاری ساده هستند، اما می‌توانند پاسخ‌های پیچیده میزبان را با تغییر در بیان ژن‌ها تحریک کنند.

تفاوت در علائم ناشی از ویروئیدها

به نظر می‌رسد که همه علائم ناشی از ویروئیدها در یک دسته قرار نمی‌گیرند. بعنوان مثال PSTVd و برخی دیگر از ویروئیدها از هر دو خانواده در گیاهان میزبان طبیعی یا آزمایشگاهی کوتولگی ایجاد می‌کنند. کوتولگی یا ممانعت از رشد ویژگی واکنش تاخیری (PAMP-triggered immunity) PTI است و همچنین تجمع dsRNA ناشی از تکثیر ویروئید نیز باعث به وجود آمدن چنین علائمی می‌شود. چنین مکانیسمی از طریق فعال شدن پروتئین‌های کیناز، سنتز اتیلن و دیگر واکنش‌های وابسته به PTI باعث برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن می‌شوند (Niehl and Heinlein, 2019; Flores et al. 2020). در مقابل، در بین اعضای خانواده *Avsunviroidae*، برخی واریانت‌های ویروئید موزاییک نهان هلو (*Peach latent mosaic viroid*) که دارای ۱۲ الی ۱۳ نوکلئوتید اضافی به صورت ساختار سرسبناقی بودند باعث القای کلروز برگی شدید (آلبینسم) تحت عنوان *Peach Calico (extreme chlorosis)* می‌شوند. در مقایسه با علائم کوتولگی، این علائم سریع، اختصاصی و موضعی (محدود به برگ‌های جوان) هستند (Navarro et al. 2012b). شرایط مشابهی برای دو گونه دیگر خانواده *Avsunviroidae* شامل ویروئید پیسک کلروتیک گل داودی (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*) (De la Pena and Flores, 2002) و *ASBVd* (Semancik and Szychowski, 1994) نیز گزارش شده است. به طور کلی، مقایسه

علائم و مسیرهای مولکولی دو خانواده ویروئیدی نشان می‌دهد که ویروئیدهای خانواده *Avsunviroidae* در کلروپلاست، mRNA ژن‌های دخیل در سنتز کلروپلاست و کلروفیل را بلافاصله مورد هدف قرار می‌دهند که نقش اصلی را در بروز علائم برعهده دارند و به این طریق باعث ایجاد علائم بیماری (علائم متفاوت کلروز) می‌شوند در حالی که ویروئیدهای خانواده *Pospiviroidae* که در هسته تکثیر می‌شوند در مراحل بعدی که به سیتوپلاسم منتقل شدند باعث برش برخی mRNA های میزبان شده و در نهایت باعث بروز علائم می‌شوند (Flores et al. 2020). تغییر در علائم یا بیماری‌زایی بر اثر تغییرات نوکلئوتیدی در ویروئیدها در این راستا قابل تفسیر است که ابتدا در مورد ویروئید غده دوکی سیب‌زمینی مورد تأیید قرار گرفته است (Wassenegger et al. 1996) و سپس در مورد ویروئیدهای دیگر از جمله ویروئید لکه زردی مو-۱ (*Grapevine yellow speckle viroid-1*) مشاهده است (حاجی‌زاده و سخندان بشیر ۱۳۹۲).

هم‌افزایی آلودگی در آلودگی مخلوط ویروس‌ها با ویروئیدها

شرایط آب و هوایی، تنوع توالی ویروئیدها، میزان تکثیر ویروئید و یا ویروس در یک میزبان در شدت و ظهور علائم نقش دارند (Ahmadi et al. 2017). افزایش تیترا ویروئید و هم‌افزایی علائم ناشی از ویروئیدها در آلودگی مخلوط با ویروس‌ها ممکن است به نقش سرکوب‌کننده‌های خاموشی ژن تولید شده توسط ویروس‌ها مرتبط باشد که در آلودگی هم‌زمان ویروس تریتستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus, CTV*) و ویروئید کوتولگی مرکبات (*Citrus dwarf viroid*) مورد تأیید قرار گرفته است. بیان مجزای سرکوب‌کننده‌های خاموشی *CTV* در لیمو مکزیکی تأثیر مشابهی با ویروس کامل تریتستزا در تیترا ویروئید و شدت علائم نشان داد (Serra et al. 2014). آلودگی انگور توسط ویروئیدها و نپوویروس‌ها به طور مجزا و یا در تعامل با هم اتفاق می‌افتد. به طور مثال، تعامل ویروس برگ‌بادبزی مو (*Grapevine fanleaf virus*) با هر کدام از ویروئیدهای لکه زردی ۱ یا ۲ مو بیماری رگ نواری مو را ایجاد می‌کند که علائم آن به وضوح شدت بیشتری از علائم ناشی از هر کدام از این بیمارگرها به صورت مجزا دارد (Hajizadeh et al. 2015; Ahmadi et al. 2017).

مختلف باعث بیماریزایی در میزبان گیاهی خود می‌شوند ولی اختلال در مسیر خاموشی RNA از طریق vd-siRNAs شاید مهم-ترین مسیر باشد. هدف از مطالعه بیماریزایی ویروئیدها کمک به کنترل آنها در محصولات مهم کشاورزی است بنابراین، چندین استراتژی جهت کنترل یا کاهش خسارت ناشی از ویروئید مانند جستجوی ارقام مقاوم در طبیعت و تولید آنها، القای مقاومت با جدایه‌های خفیف در جهت پیشگیری، هدف قرار دادن dsRNAs توسط آنتی بادی‌های کاتالیزوری و ریبونوکنازها و همچنین فعالیت Hairpin RNAs و small RNAs به عنوان RNAs مداخله‌گر، برای محافظت گیاهان اقتصادی تدوین شده است.

تولید محصول را در وارپته‌های حساس، بیش از ۸۰٪ کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری و چشم انداز آینده

ویروئیدها با وجود عدم توانایی تولید پروتئین و اندازه کوچک ژنوم، میزبان‌های اقتصادی زیادی را آلوده و علائم مشابه ویروسی ایجاد می‌کنند. مکانیسم بیماریزایی ویروئیدها به دلیل این اختلافات ممکن است با بیماریزایی ویروس‌ها متفاوت باشد که مورد بحث قرار گرفت. با وجود این، تحقیقات روزافزون روی ویروئیدها می‌تواند جنبه‌های دیگری از بیماریزایی آنها را در آینده مشخص نماید. به نظر می‌رسد ویروئیدها از مسیرهای

منابع

- Ahmadi G, Hajizadeh M, Roumi V. 2017. A multiplex RT-PCR for simultaneous detection of the agents of yellow speckle and vein banding diseases in grapevine. *Journal of Plant Pathology* 99:261-266.
- Alba AEM, Sägers R, Tabler M, Tsagris M. 2003. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 77:9685-9694.
- Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M. 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Disease* 91:47-50.
- Axtell MJ. 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:137-159.
- Bojic T, Beecharry Y, Pelchat M. 2012. Tomato RNA polymerase II interacts with the rod-like conformation of the left terminal domain of the potato spindle tuber viroid positive RNA genome. *Journal of General Virology* 93:1591-1600.
- Castellano M, Martinez G, Marques MC, Moreno-Romero J, Köhler C, Pallas V, Gomez G. 2016. Changes in the DNA methylation pattern of the host male gametophyte of viroid-infected cucumber plants. *Journal of experimental botany* 19:5857-68.
- Csorba T, Pantaleo V, Burgyan J. 2009. RNA silencing: an antiviral mechanism. In *Advances in Virus Research* 75:35-230.
- Daros JA, Flores R. 2002. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *The EMBO Journal* 21:749-759.
- De la Pena M, Flores R. 2002. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *Journal of Molecular Biology* 321:411-21.
- Di Serio F, De Stradis A, Delgado S, Flores R, Navarro Ramirez B. 2013. Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 7:288.
- Di Serio F, Flores R, Verhoeven JT, Li SF, Pallas V, Randles JW, Sano T, Vidalakis G and Owens RA. 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology* 159:3467-3478.
- Di Serio F, Li SF, Pallas V, Owens RA, Randles JW, Sano T, Verhoeven JT, Vidalakis G, Flores R. 2017. Viroid Taxonomy. In: *Viroids and Satellites*. Academic Press 135-146.
- Diener TO. 1987. Biological properties. In: *The Viroids*. Springer, Boston, MA.
- Diener TO. 2001. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?. *Advances. Virus Research* 57:137-84.
- Ding B, Itaya A. 2007. Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:7-20.
- Dube A, Bisailon M, Perreault JP. 2009. Identification of proteins from *Prunus persica* that interact with peach latent mosaic viroid. *Journal of Virology* 83:12057-67.

- Faggioli F, Loreti S, Barba M. 1997.** Occurrence of peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Disease* 81:423-423.
- Flores R, Di Serio F, Hernandez C. 1997.** Viroids: the noncoding genomes. In *Seminars in Virology* 8:65-73.
- Flores R, Di Serio F, Navarro B, Owens RA. 2017.** Viroid Pathogenesis. In: *Viroids and Satellites*. Academic Press 93-103.
- Flores R, Hernandez C, Alba AE, Daros JA, Serio FD. 2005.** Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139.
- Flores R, Navarro B, Delgado S, Serra P, Di Serio F. 2020.** Viroid pathogenesis: a critical appraisal of the role of RNA silencing in triggering the initial molecular lesion. *FEMS Microbiology Reviews* 44:386-398.
- Gago-Zachert S. 2016.** Viroids, infectious long non-coding RNAs with autonomous replication. *Virus Research* 212:12-24.
- Gomez G, Martinez G, Pallas V. 2009.** Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends in Plant Science* 14:264-269.
- Gomez G, Pallas V. 2001.** Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:910-913.
- Gozmanova M, Denti MA, Minkov IN, Tsagris M, Tabler M. 2003.** Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Research* 31:5534-5543.
- Gucek T, Jakse J, Matousek J and Radisek S. 2019.** One-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four viroids from hop (*Humulus lupulus* L.). *European Journal of Plant Pathology* 154:273-286.
- Hajizadeh M and Sokhandan Bashir N. 2013.** Identification, Molecular and Phylogenetic Analyses of *Grapevine yellow speckle viroid-1* from the Northwest Region of Iran. *Applied Research in Plant Protection* 2: 27-39. (In Farsi with English abstract)
- Hajizadeh M, Navarro B, Bashir NS, Torchetti EM Di Serio F. 2012.** Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. *Journal of Virological Methods* 179:62-69.
- Hajizadeh M, Torchetti EM, Sokhandan-Bashir N, Navarro B, Doulati-Baneh H, Martelli GP, Di Serio F. 2015.** Grapevine viroids and Grapevine fanleaf virus in North-west Iran. *Journal of Plant Pathology* 97:363-368.
- Hammond RW, Zhao Y. 2009.** Modification of tobacco plant development by sense and antisense expression of the tomato viroid-induced AGC VIIa protein kinase PKV suggests involvement in gibberellin signaling. *BMC plant biology* 9:108.
- Hammond RW. 1994.** Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology* 201:36-45.
- Itaya A, Matsuda Y, Gonzales RA, Nelson RS, Ding B. 2002.** Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:990-999.
- Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B. 2007.** A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *Journal of Virology* 81:2980-2994.
- Jiang J, Smith HN, Ren D, Mudiyansele SD, Dawe AL, Wang L, Wang Y. 2018.** Potato spindle tuber viroid modulates its replication through a direct interaction with a splicing regulator. *Journal of Virology* 92(20).
- Kalantidis K, Denti MA, Tzortzakaki S, Marinou E, Tabler M, Tsagris M. 2007.** Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in *Nicotiana* plants. *Journal of Virology* 81:12872-12880.
- Keese P, Symons RH. 1985.** Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82:4582-4586.
- Lin L, Li R, Mock R, Kinard G. 2012.** One-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four pome tree viroids. *European Journal of Plant Pathology* 133:765-772.
- Maniataki E, Tabler M, Tsagris M. 2003.** Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9:346-354.
- Martin R, Arenas C, Daròs JA, Covarrubias A, Reyes JL, Chua NH. 2007.** Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367:135-146.
- Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. 2012a.** Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. *Biochimie* 94:1474-1480.
- Navarro B, Gisel A, Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. 2012b.** Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating

- viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant Journal* 70:991-1003.
- Niehl A, Heinlein M. 2019.** Perception of double-stranded RNA in plant antiviral immunity. *Mol Plant Pathol* 20:1203-10.
- Owens RA, Hammond RW. 2009.** Viroid pathogenicity: one process, many faces. *Viruses* 1:298-316.
- Owens RA, Tech KB, Shao JY, Sano T, Baker C J. 2012.** Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:582-598.
- Pray LA. 2004.** Viroids, viruses, and RNA silencing: the small RNA world just got bigger. *The scientist* 18:23-24.
- Qi Y, Ding B. 2003.** Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell* 15:1360-1374.
- Randles JW, Rodriguez MJ, Imperial JS. 1988.** Cadang-cadang disease of coconut palm. *Microbiological Sciences* 5:18-22.
- Reanwarakorn K, Semancik JS. 1999.** Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89:568-574.
- Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. 1976.** Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73:3852-3856.
- Semancik JS, Szychowski JA. 1994.** Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75:1543-1549.
- Serra P, Bani Hashemian SM, Fagoaga C, Romero J, Ruiz-Ruiz S, Gorris MT, Bertolini E, Duran-Vila N. 2014.** Virus-viroid interactions: Citrus Tristeza Virus enhances the accumulation of Citrus Dwarfing Viroid in Mexican lime via virus-encoded silencing suppressors. *Journal of Virology* 88:1394-7.
- Vazquez Prol F, Lopez-Gresa MP, Rodrigo I, Belles JM, Lison P. 2020.** Ethylene is Involved in Symptom Development and Ribosomal Stress of Tomato Plants upon Citrus Exocortis Viroid Infection. *Plants* 9:582.
- Walia Y, Dhir S, Zaidi AA, Hallan V. 2015.** Apple scar skin viroid naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *RNA Biology* 12:1131-8.
- Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, Wu RM, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A. 2004.** On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:3275-3280.
- Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y, Li Z. A. 2009.** A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal of Plant Pathology* 124:175-180.
- Wei S, Bian R, Andika IB, Niu E, Liu Q, Kondo H, Yang L, Zhou H, Panga T, Liana Z, Liua X, Wu Y, Sun L. 2019.** Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116:13042-50.
- Wolff P, Gilz R, Schumacher J, Riesner D. 1985.** Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Research* 13:355-67.
- Yaguchi S, Takahashi T. 1985.** Syndrome characteristics and endogenous indoleacetic acid levels in cucumber plants incited by hop stunt viroid/Syndrom-Eigenschaften und endogene Indoleessigsäuregehalte in Gurkenpflanzen nach Induktion durch das Hopfenstaucheviroid. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection* 263-269.
- Zhao X, Liu X, Ge B, Li M, Hong BA. 2015.** A multiplex RT-PCR for simultaneous detection and identification of five viruses and two viroids infecting chrysanthemum. *Archives of Virology* 160:1145-1152.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Viroids; pathogenicity and changes in the host proteome and transcriptome

Fahimeh Amirnia, Mohammad Hajizadeh

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

*Corresponding Author, Email: m.hajizadeh@uok.ac.ir

Abstract

Because of the small size of viroids (~246- 436 nucleotides), lack of protein-coding capacity, and causing some severe diseases, the virulence mechanism of viroids in host is being one of the interesting aspects of their study. Direct and indirect interaction between viroids and host factors in various studies has been proved; resulting to change in proteome and host transcripts and finally disease in plants. Latest presented model for these changes is the RNA silencing mechanism that has been proved for both viroid families. This review highlights the latest finding on pathogenicity mechanisms of viroids.

Key words: *Avsunviroidae*, *Pospiviroidae*, Cross-talking biochemical, RNA silencing, Host factor