

Serin İklim Tahıllarında Virüs Kaynaklı Gen Susturma: BSMV Kullanımı

Emre İLHAN¹ A. Hakan EREN² Mustafa ERAYMAN³

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Altınözü Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, 31750, Hatay

²Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 31034, Hatay

³Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 31034, Hatay (merayman@mku.edu.tr)

Geliş Tarihi : 26.03.2013

Kabul Tarihi : 08.05.2013

ÖZET : Bitkiler doğada canlılıklarını sürdürebilmek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. RNA ortamı antiviral savunma mekanizması olarak bilinen Virüs Kaynaklı Gen Susturma (VIGS) bu mekanizmalardan biridir. Virüsle enfekte olmuş bitkilerde, virüs genomuna karşı savunma mekanizması çalışmaktadır. Aynı zamanda hedef geni taşıyan virüs vektörleri homolog içgen mRNA'larını da bozabilmektedir. Bununla birlikte VIGS genin fonksiyonunu anlamada ve fonksiyonel genomik analizleri için kullanılmaktadır. Birçok bitki için virüs vektörleri geliştirilmiştir. Son zamanlarda tahıllar için Arpa Çizgili Mozaik Virüsü (Barley Stripe Mosaic Virus = BSMV) kullanılmaya başlanmıştır. BSMV geniş bir konukçu aralığına sahip pozitif polariteli bir RNA virüsü olup, *Hordeivirus* genusunun bir üyesidir. Üç farklı genom RNA (α , β ve γ)' dan oluşmaktadır. Bu çalışmada BSMV vektörünün çalışma prensibi ve bazı tahıllarda BSMV – VIGS'in uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler : VIGS, Gen susturma, BSMV, Tahıllar

Virus Induced Gene Silencing in Cold Season Cereals: The Use of Bsmv Vector

ABSTRACT : Plants developed various defense mechanisms in order to maintain their lives in nature. Virus induced gene silencing (VIGS) which is known as RNA mediated antiviral defense mechanism is one of these mechanisms. In plants with infected unmodified viruses, the mechanism is target against the viral genome. The virus vectors carrying the target genes can be also targeted homogeneous mRNAs. However, VIGS has been widely used for analysis of gene function and functional genomics. These virus vectors were developed for a lot of plants. Recently, Barley Stripe Mosaic Virus (BSMV) has been started utilizing for cereals. BSMV is a positive-sense RNA virus with a broad experimental host range and is the type member of the *Hordeivirus* genus. The tripartite genome consists of RNAs α , β and γ . In this study, the experimental principles of BSMV vector and the knowledge about BSMV – VIGS studies applied in some cereals were given.

Keywords: VIGS, Gene Silencing, BSMV, Cereals

Kısaltmalar :

RNA	Ribonükleik asit
PTGS	Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma = Post Transcription Gene Silencing
RNAi	Müdahaleci RNA = RNA interference
RdRp	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz = RNA dependent RNA Polymerase
dsRNA	Çift dizinli RNA = Double strand RNA
siRNA	Küçük müdahaleci RNA = Small Interference RNA
RISC	RNA kaynaklı Susturma Kompleksi = RNA induced Silencing Complex
TGS	Transkripsiyonel Gen Susturma = Transcriptional Gene Silencing
VIGS	Virüs Kaynaklı Gen Susturma = Virus induced Gene Silencing
BSMV	Arpa Çizgili Mozaik Virüsü= Barley Stripe Mosaic Virus
cDNA	Tamamlayıcı DNA = Complementary DNA
TMV	Tütün Mozaik Virüsü = Tobacco Mosaic Virus
PVX	Patates Virüs X = Potato Virus X

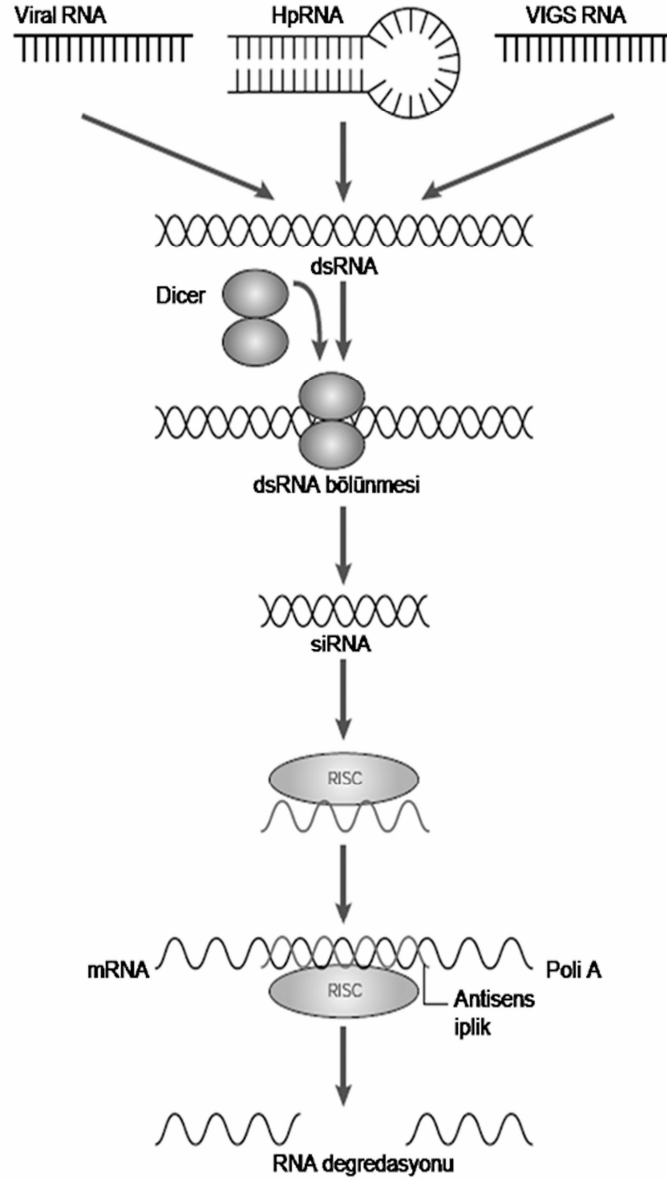
GİRİŞ

Bitkiler doğada canlılıklarını sürdürebilmek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkilerin sahip oldukları bu savunma mekanizmaları; fiziksel yapılar (tüylülük, mumlaşma, kütikula tabakasının kalınlaşması gibi), patojen girişini engelleyen biyokimyasal reaksiyonlar, patojenin girişinden sonra bitkinin salgıladığı toksik bileşikler, enfeksiyondan sonra salgılanan enzimler ve bitkilerin kalıtsal dayanıklılıkları şeklinde sıralanabilir (Değirmenci ve Ertunç, 2010). Günümüzde bu savunma mekanizmaları moleküler düzeyde açıklanabilmektedir. Virüsler tarafından enfekte edilmiş bir bitki, virüse karşı savunma

mekanizmasını çalıştırmaktadır. Bu mekanizmalar farklı şekillerde ortaya çıkmaktadır. Bunlardan birisi RNA'ya dayalı gen sessizleştirme mekanizmasıdır. Bitkilerde Transkripsiyon Sonrası Gen Susturma, *Neurospora crassa*'da gen quelling ve *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* ve memeliler gibi hayvanlarda ise RNAi olarak belirlenmiştir (Duan vd., 2012; Fagard vd., 2000). Transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması sitoplazmada bitkinin kendi RNA'larını ve transgen RNA'ları hedeflemektedir. Bu mekanizma RNA virüsleri tarafından tetiklenmektedir. Viral genomik RNA ile enfekteli bitki hücresi RNA'ya bağımlı RNA

polimeraz (RdRp) enzimini üretmektedir. Bu enzim bir RNA'yı kalıp olarak çift dizinli RNA (dsRNA)'yı sentezlemektedir. Sitoplazmadaki dsRNA RNaz III ailesinin bir üyesi olan DICER enzimi ile birleşmektedir. Bu birleşme sonrasında 18 – 25 nükleotid uzunluğunda siRNA'lar ortaya

çıkılmaktadır. Bu siRNA'lar RISC adı verilen kompleks ile birleşerek hedef viral RNA'yı parçalamaktadır. Bu şekilde viral patojen RNA'ları susturulmaktadır (Değirmenci ve Ertunç, 2010; Karakurt ve Karakurt, 2008; Fagard vd., 2000) (Şekil 1).



Şekil 1.VIGS yönteminin işleyişi (Waterhouse ve Helliwell, 2003)

Bitkilerde hedef genin ifadesinin köreltilmesi (knock down) veya susturulması amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar TGS ve PTGS'dir (Bruch – Smith vd., 2004). Bitkilerde hedef bir genin ifade düzeyini baskılamada kullanılan yöntemlerden birisi de VIGS'tir (Unver ve Budak,

2009). Bu yaklaşımda dsRNA'lar kısa müdahaleci RNA'lara (siRNA) dönüştürüldüğü transkripsiyon sonrası gen susturmayla ilişkili olan konukçuların savunma mekanizmasını tetiklemektedir (Ma vd., 2012). Yani sitoplazmada biriken dsRNA'ların varlığı ile bu mekanizma işlev kazanmaktadır (Lui,

2002). İlgilenilen gen bir virüs vektörüne yerleştirilir ve bu şekilde rekombinant virüs elde edilir. Bu virüs, bitkideki konukçu savunma mekanizmayı ve hem virüs genomunu hem de degradasyon için vektöre yerleştirilmiş hedef diziyeye homolog içgen mRNA'larını tetikleyecektir (Brodersen ve Voinnet, 2006). VIGS ile başlatılan susturma işlemi veya enfeksiyon sistemik olarak bitkiye yayılmaktadır. Enfeksiyonlu bitkilerdeki semptomlar kodlanmış proteindeki fonksiyonun kaybını yansıtmaktadır (Ma vd., 2012; Lu vd., 2003).

Çeşitli bitki türleri için pek çok viral vektör VIGS yöntemini uygulamak amacıyla geliştirilmiştir. VIGS için ilk vektörler tütün ve domateste kullanılan TMV ve PVX olmuştur (Yuan vd., 2011; Constantin vd., 2004; Holzberg vd., 2002). İlk VIGS denemeleri dikotil bitkilerde uygulanmasına rağmen, son zamanlarda yapılan çalışmalarda BSMV'nin kullanılmasıyla monokotil bitkilerde de uygulanmaya başlamıştır (Ma vd., 2012; Lee vd., 2012; Yuan vd., 2011; Cakir vd., 2010; Campbell ve Huang, 2010; Holzberg vd., 2002).

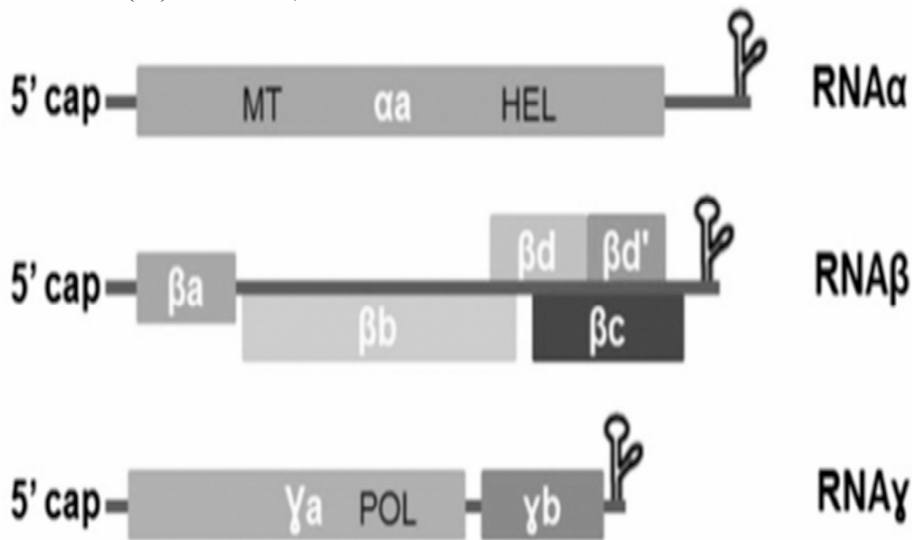
Bu yöntem buğday, arpa ve çeltik gibi monokotil bitkilerde özellikle gen fonksiyonları, bitki patojen etkileşimlerinin ortaya çıkarılması ve bitkilerde bakteriyel, fungal ve viral patojen hastalıklarına direncin tespit edilmesi amacıyla uygulanmaktadır (Bennypaul vd., 2011; Çakır vd., 2010; Bruch – Smith vd., 2004).

VIGS yönteminin gen susturmada bazı avantajları vardır. (I) İlgilenilen genin fenotipini ortamdan kaldırma, yani deneysel aşamanın sonuçlanması 3 – 4 hafta içinde olmaktadır. (II) VIGS ilgilenilen genin tam boy cDNA'sına ihtiyaç duyulmadan ve deneyler tam gen sekans bilgisi olmadan başlatılabilir. (III) Susturma, VIGS –

BSMV vektörüyle bitkiler enfekte edilerek başlatılır, susturma geçici olup susturmadan sonraki VIGS fenotipi bitkinin bazı kısımlarında ortaya çıkmaktadır. (IV) VIGS, buğday gibi allopoliploid tahılların homolog lokuslarını çalışmada faydalı olmaktadır. Çünkü susturma homolojiye bağlıdır ve en az %85 sekans homolojisini paylaşan transkriptler degradasyon için hedeflenmektedir (Çakır vd., 2010; Scofield ve Nelson, 2009; Scofield vd., 2005). VIGS yöntemini uygulamada en önemli sınırlama uygun vektörün olmamasıdır (Scofield ve Nelson, 2009). Bu derleme çalışmasında BSMV vektörünün çalışma prensibi ve bazı tahıllarda BSMV – VIGS'in uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir.

BSMV'NİN GENOMİK YAPISI

BSMV arpa, buğday, çeltik, ulaf ve mısır gibi monokotil bitkiler için enfekte edici ve bu tahıllar için uygun bir vektördür (Robertson, 2004). BSMV vektörü ilk olarak Gustafson ve ark. (1989, 1987, 1986) tarafından tüm genomunun sekansı ile elde edilmiştir. BSMV *Hordeivirus* genusunun bir üyesidir. Pozitif polariteli bir RNA virüsüdür. RNA'sı α , β ve γ olmak üzere 3 parçalı bir genoma sahiptir. Genomik RNA'lar 5' ucunda metilasyonlu cap yapısına, 3' ucunda ise tRNA yapısına benzeyen trozin ile biten bir poliadenilat sekansına sahiptir. BSMV ND18 suşunun RNA α genomu, RdRp'nin metiltransferaz/helikaz alt birimini, RNA β , kılıf proteinini ve virüsün hücreler arasındaki hareketini sağlayan TGB1, TGB2, TGB3'den oluşan 3'lü gen blok (TGB) proteinini, RNA γ ise RdRp'nin polimeraz alt birimini ve γb proteinini kodlamaktadır (Yuan vd., 2011; Jackson vd., 2009; Bragg vd., 2008) (Şekil 2).

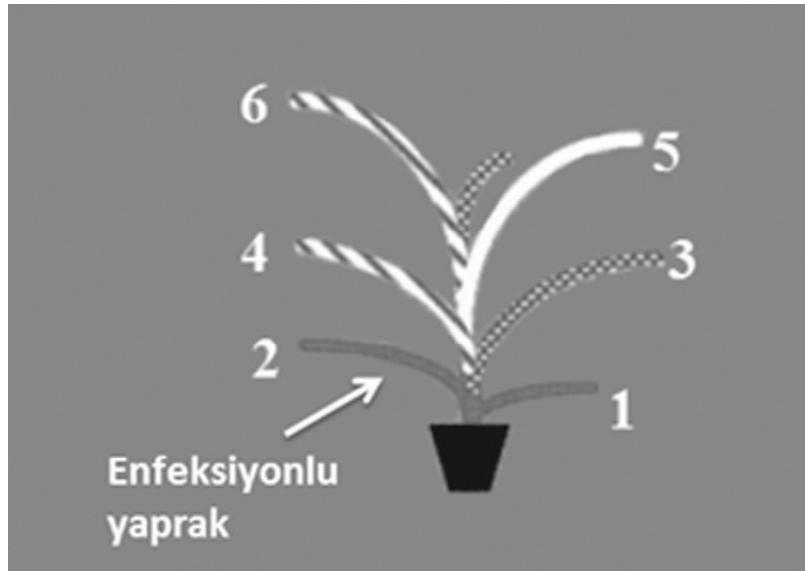


Şekil 2. BSMV virüsünün genomik yapısı (Lee vd., 2012)

BSMV'İN HAZIRLANMASI VE BULAŞTIRILMASI

BSMV vektörünün genomu enfeksiyonlu transkriptlerin *in vitro* üretimine izin verecek yapıdadır (Scofield ve Nelson, 2009). BSMV – VIGS çalışmalarında kılıf proteini çıkarılmış mutant BSMV RNA β ($\beta.\Delta\beta$) kullanılmaktadır (Holzberg vd., 2002). Bir bitki geninden ifade olmuş dizinin bir kısmını temsil eden 120 – 500 bp'lik sens veya antisens yönlü fragmenti, $\gamma\beta$ geninin 3' ucu kodonu kesim enzimleri bölgesinde RNA γ plasmidine yerleştirilmektedir. cDNA klonlarından enfeksiyonlu BSMV RNA'ları T7 DNA – bağımlı RNA polimeraz

kullanılarak *in vitro* transkripsiyon hazırlanır. Enfeksiyon RNA α , β ve γ *in vitro* transkriptleri Pogue vd., (1998) göre hazırlanan FES ortamında eşit oranlarda (1:1:1) karıştırılarak başlatılmaktadır. Fonksiyonu belirlenecek genin FES ortamındaki transkriptleri bitkilerin iki yapraklı döneminde bitki yapraklarına Scofield vd. (2005) belirttiği şekilde bulaştırılmaktadır. Buğday ve arpa fidelerinde yapılan bir çalışmada (Hein vd., 2005) BSMV'nin sistemik olarak etkili olduğu ve inokülasyondan sonraki 3. günde BSMV'nin etkisinin belirlendiği bildirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. BSMV enfeksiyonunun yapraklardaki dağılımı (Holzberg vd., 2002)

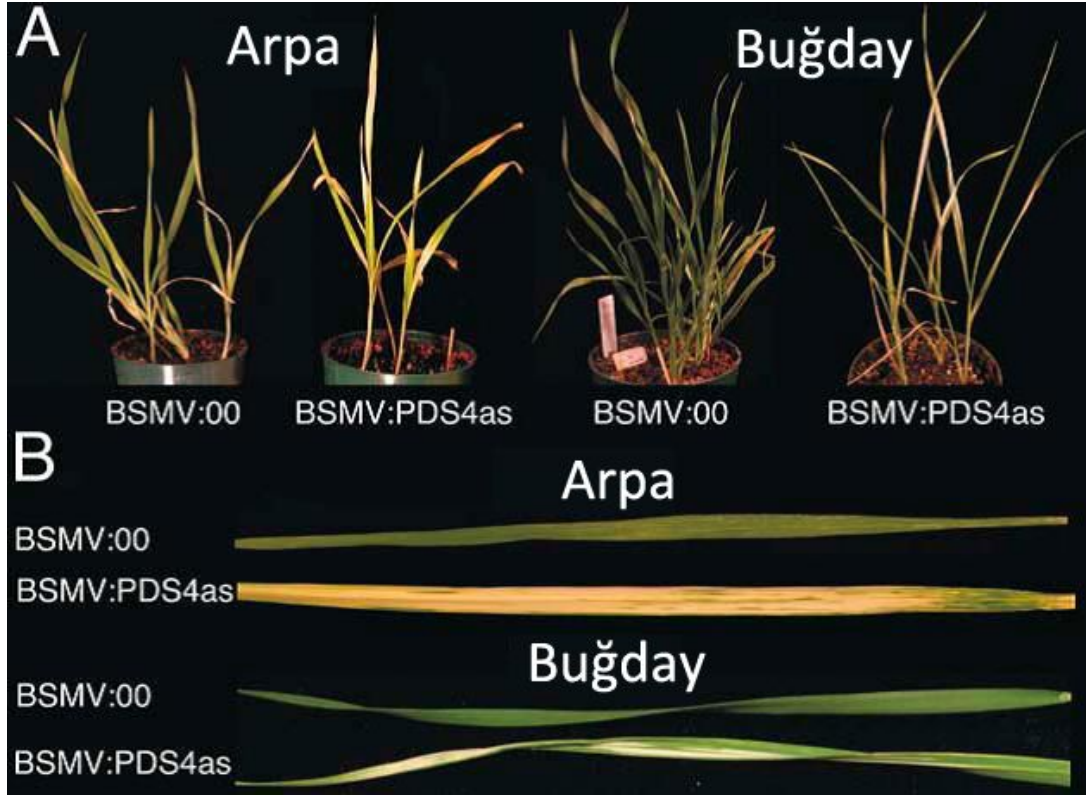
BAZI TAHILLARDAKİ BSMV UYGULAMALARI

BSMV-VIGS yöntemiyle buğday ve arpada bazı genlerin fonksiyonları belirlenmiştir. Arpada spesifik monokotil *P23k* geni BSMV- VIGS yöntemiyle susturulmuş ve susturma sonrasında bitkilerde morfolojik anormallikler tespit edilmiştir (Oikawa vd., 2007). Yine arpada selüloz sintaz (*CesA*) geninin hücre duvarı biyosentezinde görev aldığı belirlenmiştir (Held vd., 2008).

Buğdayda BSMV ile yapılan gen susturma çalışmalarında magnezyum protoporfirin kompleksi (*ChlH*), fosfolipaz, , *Lr1*, 20S proteozom gibi bir çok gen ve gen ailesi ile yapılmış çalışmalar mevcuttur (Scofield vd., 2005; Tai vd., 2005; Yuan vd., 2011; Cloutier vd., 2007).

Kuraklık stresine dayanıklılığı artırmada rol

oynayan *Arabidopsis thaliana* gen homologları ile buğdayda yapılan bir çalışmada *Eral* (abscisikasite gelişmiş yanıt), *Cyp707a* (ABA 8' – hidroksilaz) ve *Sall* (inositol polifosfat 1 fosfat) genleri susturulmuştur. Bu genlerden *Cyp707a* BSMV₀ – enfeksiyonlu bitkilere göre sınırlı su şartları altında hiç bir gelişme göstermemiştir. Buna karşın *Eral* ve *Sall* buğdaydaki kuraklık toleransı için önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir (Manmathan vd., 2013). Ayrıca yapılan bu çalışmaların bir çoğunda klorofil fotooksidasyondan koruyan karotenoidlerin biyosentezinde görev alan fitoen dismutaz (*PDS*) geni raportör olarak kullanılmıştır. Fotosentezde görev alan bu enzim susturulduğunda ışığa maruz kalan fotosentetik dokularda beyazlaşmalar görülmüştür (Campbell ve Huang, 2010) (Şekil 4).

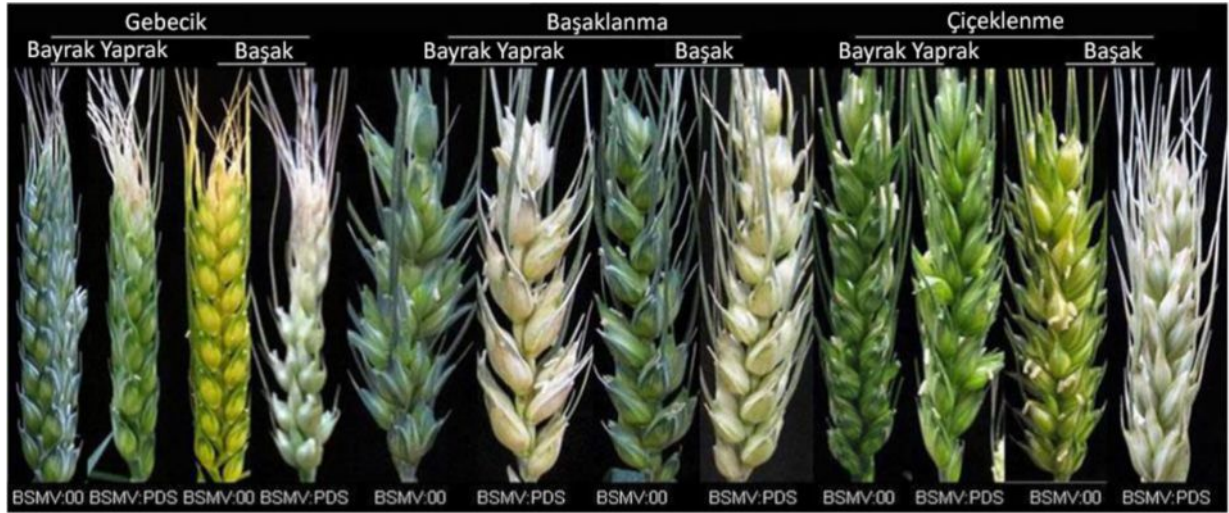


Şekil 4. Arpa ve buğdayda BSMV vektörüyle PDS'nin susturulması. Hulless arpa ve Bobwhite buğday çeşitleri çimlenmeden 7 sonra BSMV:00 ve BSMV:PDS4as ile enfeksiyona maruz bırakılmıştır. Fotoğraf enfeksiyon uygulamasından 12 sonra (12 dpi) alınmıştır. A, tüm bitkiler; B, tek yapraklar (Scofield vd., 2005)

Buğday ve arpada virüs kaynaklı gen susturmayla gen fonksiyonunun belirlenmesi yönelik çalışmalarının yanı sıra bu tekniğin buğday ve arpa bitkilerinde hastalıklara dayanıklılık çalışmalarında da kullanımının faydalı olacağı bildirilmiştir (Yuan vd., 2011; Çakır vd., 2010). Nitekim, Eck vd., (2010), buğdayda afide dayanıklılıkta *WRKY53* transkripsiyon faktörünü ve fenilpropanoid metabolik yolunu belirlemek üzere yapmış oldukları çalışmada BSMV-VIGS yöntemini kullanmışlardır. Yaprak pasına dayanıklılığın belirlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada (Scofield vd., 2005) ise BSMV-VIGS yöntemiyle *Lr21* geninin fonksiyonu tespit edilmiştir. Yine, bu çalışmada *HSP90*, *SGT1* ve *RARI* genleri BSMV – VIGS yöntemiyle susturulmuştur.

Şu ana kadar ki yapılan çalışmalarda genellikle arpa ve buğday bitkilerinin fide dönemlerinde gen

susturma uygulanmıştır. BSMV RNA'larıyla yaşlı buğday bitkilerinin üst yapraklarındaki inokulasyonla bayrak yaprağı ve floral organlarda da VIGS uygulaması yapılabilmektedir. Nitekim, son zamanlarda yapılan bir çalışmada (Ma vd., 2012) BSMV – VIGS olgun buğday başağının farklı dönemlerinde de uygulanabileceği gösterilmiştir (Şekil 5.). Bu şekildeki uygulamalar floral dokulardaki çiçeklenme, tohum gelişimi, dane kalitesi ve patojen savunmasını kontrol eden genetik yolları analiz etmeyi mümkün kılacaktır (Scofield vd., 2005). Buğdayın kök, yaprak ve mayotik dokularında ifade olunan genleri susturma amacıyla BSMV virüsünü kullanımının yanı sıra bitki gelişiminin erken dönemlerinde ve özellikle tohum çimlenmesi süresince yapılan BSMV – VIGS uygulamalarının gen ifadesi araştırmalarında daha faydalı olduğu bildirilmiştir (Bennypaul vd., 2012).



Şekil 5. Buğday başağının farklı dönemlerinde PDS geninin susturulması (Ma vd., 2012)

VIGS'İN GELECEĞİ

VIGS gen fonksiyonu, fonksiyonel genomik ve bitki – patojen ilişkisini ortaya çıkarmada gelecek vadeden bir araç olarak görülmektedir (Bruch – Smith vd., 2004). Günümüzde tütün (TRV, TMV), domates (TBSV), patates (PVX), arpa (BSMV), brom (BMV), bezelye (PEBV) ve elma (ALSV) gibi monokotil ve dikotil bitkiler için kullanılan VIGS vektörleri mevcuttur (Yuan vd.,2011; Grønlund vd., 2010). Güvenilir ve etkili olarak kullanılan vektörler sınırlı sayıdadır. Bu nedenle vektörlerin geliştirilmesi için daha geniş aralıklarda konukçu tespit edilmesi gerekmektedir. Ayrıca VIGS çalışmasının yapılabilmesi için sekans bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da VIGS çalışmalarını sınırlayan bir diğer sebep olmaktadır. Ulusal ve uluslararası düzeyde veri tabanlarının kurulması gerekmektedir. Yine bu çalışmalar için akraba türlerin EST veri tabanları da yararlı olabilecektir. Bu şekilde VIGS için primer dizayn etmek ve gen hedeflerin belirlemek daha kolay olacaktır.

Diğer monokotil ve dikotil bitkileri enfekte eden vektörlerin zamanla geliştirilmesi için yapılan çalışmalar devam etmektedir (Scofield vd., 2009). Vektörlerin zamanla geliştirilmesiyle VIGS'in geleceğinin de parlak olacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Bennypaul, H. S., Mutti, J. S., Rustgi, S., Kumar, N., Okubara, P. A., Gill, K. S. 2012. Virus-induced gene silencing (VIGS) of genes expressed in root, leaf, and meiotic tissues of wheat. *Funct Integr Genomics*, 12:143–156.
- Bragg, J.N., Lim, H.S., Jackson, A.O., 2008. *Hordeivirus*. In: Mahy BWJ, Regen mortal MHVv, eds. *Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. Oxford: Academic Press. pp 459–467.

- Brodersen, P. And Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, 22, 268–280.
- Burch-Smith, T.M., Anderson, J.C., Martin, G.B. and Dinesh-Kumar, S.P., 2004. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J.*, 39, 734–746.
- Cakir, C., Gillespie, M.E. and Scofield, S.R., 2010. Rapid Determination of Gene Function by Virus-induced Gene Silencing in Wheat and Barley. *CropSci*. 50:77–84.
- Campbell, J., and Huang, L., 2010. Silencing of Multiple Genes in Wheat Using *Barley Stripe Mosaic Virus*. *Journal of Biotech Research*, 2:12-20.
- Cloutier, S., McCllum, B.D., Loutre, C., Banks, T.W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M.C., 2007. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Mol Biol*, 65:93–106.
- 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.
- Değirmenci, K., Ertunç, F., 2010. Virüs Enfeksiyonları ile Mücadelede Gen Susturulması ve Uygulamaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Derg.* TR, 8:35-52.
- Duan, C.G., Wang, C.H., Guo, H.S., 2012. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence*, 3:5.
- Eck, L., Schultz, T., Leach, E.L., Scofield, S.R., Pears, F.B., Botha, A.M., and Lapitan, N.L.V., 2010. Virus-induced gene silencing of *WRKY53* and an inducible phenylalanine ammonia-lyase in wheat reduces aphid resistance. *Plant Biotechnology Journal* 8, pp. 1023–1032.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, G., and Vaucheret, H., 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America*. vol. 97, no. 21, p. 11650-11654.
- Grønlund, M., Olsen, A., Johansen, E.I., Jakobsen, I., 2010. Protocol: using virus-induced gene silencing to study the arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Pisum sativum*. *Plant Methods*, 6:28.
- Gustafson, G. And Armour, S.L., 1986. The complete nucleotide sequence of RNA beta from the type strain of barley stripe mosaic virus. *Nucleic Acids Res.*, 14 (9), 3895-3909.
- Gustafson, G., Armour, S.L., Gamboa, G.C., Burgett, S.G. and Shepherd, J.W., 1989. Nucleotide sequence of barley stripe

- mosaic virus RNA alpha: RNA alpha encodes a single polypeptide with homology to corresponding proteins from other viruses. *Virology*, 170 (2), 370-377.
- Gustafson, G., Hunter, B., Hanau, R., Armour, S.L., and Jackson, A.O., 1987. Nucleotide sequence and genetic organization of barley stripe mosaic virus RNA gamma. *Virology*, 158 (2), 394-406.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I.E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K., Lacomme, C., 2005. Virus-induced gene silencing-based functional characterization of genes associated with powdery mildew resistance in barley. *Plant Physiol*, 138:2155–2164.
- Held, M.A., Penning, B., Brandt, A.S., Kessans, S.A., Yong, W., 2008. Small- interfering RNAs from natural antisense transcripts derived from a cellulose synthase gene modulate cell wall biosynthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 20534–20539.
- Holzberg, G. S., Brosio, P., Gross, C., Pogue, G.P., 2002. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *Plant J*, 30: 315-327.
- Jackson, A.O., Lim, H-S, Bragg, J., Ganesan, U., Lee, M.Y., 2009. Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol*, 47: 385–422.
- Karakurt, Y., Karakurt, H., 2008. The potential Contribution of RNAi to Plant Nutritional Value. *Journal of Molecular Biology&Biotechnology*, 1:39-44.
- Lee, W.S., Hammond-Kosack, K.E., and Kanyuka, K., 2012. Barley Stripe Mosaic Virus-Mediated Tools for Investigating Gene Function in Cereal Plants and Their Pathogens: Virus-Induced Gene Silencing, Host-Mediated Gene Silencing, and Virus-Mediated Overexpression of Heterologous Protein. *Plant Physiology*, 160:582–590.
- Liu, Y.L., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S.P., 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J*, 2002, 31:777–786.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A.M., Peart, J.R., Malcuit, I., and Baulcombe, D.C., 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30:296–303.
- Manmathan, H., Shaner, D., Snelling, J., Tisserat, N., and Lapitan, N., 2013. Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 1:1 -12.
- Ma, M., Yan, Y., Huang, L., Chen, M., and Zhao, H., 2012. Virus-induced gene-silencing in wheat spikes and grains and its application in functional analysis of HMW-GS-encoding genes. *BMC Plant Biology*, 12:141.
- Oikawa, A., Rahman, A., Yamashita, T., Taira, H., Kidou, S.I., 2007. Virus-induced gene silencing of *P23k* in barley leaf reveals morphological changes involved in secondary wall formation. *J Exp Bot*, 58: 2617–2625.
- Pogue, G.P., Lindbo, J.A., Dawson, W.O., 1998. Tobamovirus Transient Expression Vectors: Tools for Plant Biology and High - Level Expression of Foreign Proteins in Plants. In: Turpen TH (ed), *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands.
- Robertson, D. 2004. VIGS vectors for gene silencing: Many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol*, 55:495–519.
- Scofield, S. R., Brandt, A.S., 2012. Virus-induced gene silencing in hexaploid wheat using barley stripe mosaic virus vectors. *Methods Mol Biol*, 894:93-112.
- Scofield, S.R., Huang, L., Brandt, A.S., and Gill, B.S., 2005. Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in Functional Analysis of the *Lr21*-Mediated Leaf Rust Resistance Pathway. *Plant Physiology*, 138: 2165–2173.
- Scofield, S.R., Nelson, R.S., 2009. Resources for virus-induced gene silencing in the grasses. *Plant Physiol*, 149: 152–157.
- Tai, Y.S., Bragg, J., Edwards, M.C., 2005. Virus vector for gene silencing in wheat. *Biotechniques*, 39:310–4.
- Unver, T., and Budak, H., 2009. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method. *International Journal of Plant Genomics*, 2009:1 – 8.
- Waterhouse, P.M., and Helliwell, C.A., 2003. Exploring Plant Genomes By RNA-Induced Gene Silencing. *Nature*, 4:29 – 38.
- Yuan, C., Li, C., Yan, L., Jackson, A.O., Liu, Z., 2011. A High Throughput Barley Stripe Mosaic Virus Vector for Virus Induced Gene Silencing in Monocots and Dicots. *PLoS ONE*, 6(10).