



Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak virüse dirençli bitkilerin elde edilmesi

Mikail AKBULUT¹, Osman GÜLSEN²

¹ Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

² Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kayseri

ÖZET

Bilim adamları, viral veya nonviral orijinli genleri kültür bitkilerine aktararak, birçok bitkiye virüslere karşı direnç kazandırmışlardır. Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkisinde Tütün Mozaik Virüsüne (TMV) karşı viral kılıf protein aracılığıyla oluşturulan direnç, tarihsel olarak bunun ilk örneği olmuştur. Diğer birçok virüs türevli DNA dizilerinin bitki virüslerine karşı direnç sağladığı da birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu diziler arasında, translasyon yapılmayan sense veya antisense RNA, satelit RNA, eksik (defektif) müdahale eden RNA, viral replikaz, proteaz, taşınma proteinleri ve nötralize edici antikorlar sayılabilir. Virüsten türetilmiş genlere ek olarak bitkisel orijinli genlerde transgenik direnç için kullanılabilir. Bu direnç mekanizmasında, genler diğer direnç genlerinde (R genleri) olduğu gibi virüse özgü olabilir. Transgen aracılı direncin avantajlarına rağmen virüs dirençli transgenik bitkilerin üretimi ve kullanımı henüz yaygın olmayıp yakın gelecekte bu teknolojinin daha da yaygınlaşacağı düşünülmektedir. Bu makalede, ekonomik olarak önemli kültür bitkilerine virüs direncini aktarmak için kullanılan rekombinant DNA teknolojisinin stratejileri ve güncel uygulamaları kısaca özetlenecektir.

Anahtar Kelimeler

Patojen kaynaklı direnç,
transgenik bitki,
bitki virüsleri,
virüs dirençli bitkiler

Genetically engineered plants resistant against plant viruses

ABSTRACT

Researchers developed many plants resistant to viruses by genetically engineering viral and non-viral genes. In *Nicotiana tabacum*, resistance mechanism achieved by transferring viral coat protein of tobacco mosaic virus (TMV) was the first example of this approach. Many other viral DNA sequences were determined to be effective in obtaining virus resistant plants. Among these, non-translated sense and antisense RNA, satellite RNA, defective RNA interfering, viral replicase, protease, movement proteins, and neutralizing anticore. In addition to viral sequences or genes, non-viral plant virus resistance genes can be used to develop transgenic virus resistance plants. In this, the genes, like the other resistance genes, could be virus specific. In spite of advantages of transgene-mediated resistance in plants, this mechanism is not widespread to date, but have potential in future applications. Briefly, in this study various recombinant DNA technologies used for increasing plant resistance to viruses and current applications will be summarized.

Keywords

Pathogen derived
resistance,
transgenic plants,
plant viruses,
virus resistant plants

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-posta: akbulut@erciyes.edu.tr

1. GİRİŞ

Bitki virüs hastalıkları ticari olarak değerli birçok üründe önemli verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır [1] ve bazen turuncgil ağaçlarında Turuncgil Tristeza Virüsünde (Citrus tristeza virüs) olduğu gibi tüm endüstriyi değiştiren bir etken de olabilmektedir [2]. Dünyada virüs zararından kaynaklanan kayıpların miktarının ölçülmesi zor olmasına rağmen birkaç milyar dolar seviyesinde olduğu tahmin edilmektedir. Bu miktar, virüs enfeksiyonunun azaltılması için virüsten arı materyal üretim çabalarını, vektör kontrolü için yapılan ilaçlamaları, dirençli çeşit üretimlerini, sanitasyon, münavebe ve biyolojik kontrol gibi kültürel pratikler için harcamaları kapsamamaktadır. Bitki virüsleri RNA veya DNA virüsleri olabilir. Bilinen bitki virüslerinin çoğunluğunu pozitif polariteli (positive sense) tek iplikli RNA virüsleri oluşturur [3]. Bitki virüslerine karşı kontrol önlemleri, funguslar ve bakteriler gibi diğer mikrobiyal patojenlere göre daha azdır. Yukarıda belirtilen kontrol önlemleri etkili olup ürün kaybını azaltmasına rağmen daha etkili, sürekli ve daha ucuz strateji ve yöntemlerin geliştirilmesi yürürlükte olan çabalar arasındadır. Bu stratejilerin en önemlilerinden birisi virüse dirençli kültür bitkilerinin geliştirilmesidir. Bitkilerde virüslere karşı direnç, dominant, resesif veya kantitatif (çok lokuslu veya QTL) olabilir. Virüs direnç genlerine örnek olarak Patates Y Virüsü (PVY)' ne direnç sağlayan Ry genini [1]; Patates X Virüsüne (PVX) karşı direnç sağlayan Rx1 ve Rx2 genlerini, domateste, Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne (Tomato spotted wilt virus, TSWV) karşı Sw5 genini [4] sayabiliriz. Kültür bitkilerinin geleneksel ıslah metotlarıyla genetik olarak değiştirilmesi etkilidir, fakat genellikle direnç istenilen çeşitlerde hazır olarak bulunmamakta ya da virüsün değişik ırklarına karşı etkili olmamaktadır. İstenilmeyen birçok karakterle ilgili oluşlarından dolayı diğer bitki türleri veya uzak akrabalarından elde edilen direnç genlerinin çaprazlama yoluyla transferi zordur.

Virüs hastalıklarına karşı doğal olarak oluşan diğer koruma mekanizmaları da mevcuttur. Virüs hastalıklarına karşı genetik mühendisliği yoluyla patojenden türeyen direnç ümidi 1929 yılında H.H McKinney'nin tütün bitkilerinin TMV'nin zayıf ırklarıyla bulaştırıldığında şiddetli ırklarına karşı korunduğunun gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır [5]. Virüsün zayıf ırkıyla bulaştırılan bitkilerin virüsün şiddetli ırkıyla karşılaştığında semptom gelişimine

direnmesi doğal olarak gelişen bir mekanizmadır. Çapraz korunma 'cross protection' olarak bilinen bu kontrol yöntemi o günden beri tüm dünyada uygulanmaktadır. Geleneksel çapraz korunma bazı ürün-virüs kombinasyonlarında etkili olmasına rağmen bazı potansiyel sakıncaları da mevcuttur [6].

Viral dizilerin bitkilerde direnç elde edilmesi amacıyla ifade edilmesi ilk defa Hamilton tarafından önerilmiş ve patojen türevli direnç (Pathogen Derived Resistance veya PDR) olarak isimlendirilmiştir [7]. Daha sonraları bitkilerde virüs direnci elde etmek için viral olmayan genler de tasarlanmıştır. Bitkilerde virüs direncini artırmak için rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı genetik olarak tasarlanmış direnç (genetically engineered resistance) olarak tanınmıştır. Çapraz korumayı taklit eden diğer önerilen genler kılıf ve replikaz proteinleri kodlayan [8] virüs genlerine tamamlayıcı RNA dizilerini [9] içermektedir. Genetik olarak tasarlanmış direncin teorisi ilk olarak Beachy ve meslektaşları tarafından ilk defa TMV'nin kılıf proteininin bütün bitkisine aktarılmasıyla gösterilmiştir [10]. Bu konuda birçok derleme yayınlanmıştır [11; 12; 13; 14;15;16]. Son 20 yıl içerisindeki iki önemli gelişme bitkilerin, bitkisel kökenli olmayan genlerin bitkiye eklenmesiyle geliştirilmesini mümkün kılmıştır: 1) Genlerin, izole edilmesi, klonlanması, ve dizisinin çıkartılması, 2) yabancı genlerin bitki hücrelerine sokulması ve bu hücrelerden değiştirilmiş bitkilerin elde edildikleri aktarma teknikleri. Gen dizilerinin aktarılması genellikle *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla başarılırken, nadiren protoplast tarafından direk DNA alımı ve bitki dokusunun biyolistik bombardmanı yöntemi de kullanılmaktadır.

2. VİRAL GEN YOLUYLA DİRENÇ

2.1. Kılıf proteini yoluyla koruma

Powell-Abel ve arkadaşlarının [10] öncü çalışmalarından bu yana başta pozitif polariteli tek iplikli RNA (ssRNA) içerenler olmak üzere birçok bitki virüsünde kılıf proteini aracılı direnç (CPMP) gösterilmiştir [11,17,15]. Çift iplikli DNA (dsDNA) ve tek iplikli DNA (ssDNA) genomlu virüslerde CPMP'nin başarısına yönelik çok az delil vardır. CPMP için geniş bir aralıkta direnç çeşitliliği (hastalığın ertelenmesinden, total bağışıklığa kadar değişen) gözlenmiştir. Bu tip koruma, hastalık semptomlarının hafifletilmesinden ve virüsün enfeksiyon sonrası yayılışının engellenmesinden

kaynaklanmaktadır. Çapraz korumada olduğu gibi CPMP özel bir virüs veya çok yakın ilişkili virüslerle sınırlı olduğundan, direnç mekanizması sınırlı uygulamalara sahiptir. Direncin gücü, koruyucu virüsün kılıf proteini ile onunla yarışma içinde olan hastalık virüsünün ilişkilerinin yakınlığına bağlıdır.

CPMP'nin mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Buna ilave olarak koruma sadece bütün virüs parçacığı ile sınırlı olup, enfeksiyöz çıplak nükleik asitler için geçerli olmayabilir. Bu gözlemden dolayı CPMP'nin mekanizmasının virion kılıf proteinin soyulmasının inhibisyonuyla ilgili olduğu varsayılmıştır. Diğer direnç mekanizmalarının da olabileceği konusunda da çok sayıda delil mevcuttur. Birincisi, transgenik hatların göreceli direnci bitkinin kılıf proteini üretim miktarı ile zayıf korelasyon göstermektedir. Hatta translasyon yapılmayan (fakat transkripsiyonu yapılmış) kılıf proteini geni taşıyan transgenik bitkilerde direnç gösterebilmektedir [18]. Bununla birlikte domates bitkisinde TSWV için düşük seviyede transkripsiyon yapan transgenik bitkilerin yüksek seviye de yapanlardan daha dirençli oldukları görülmüştür. Transkript aracılı direnç azalmış viral replikasyonla yüksek korelasyon göstermiştir. Bu olguda transgenik bitkilerde virus titerinin azalmasının, replikasyonu engelleyen RNA duplex oluşumu ile ilişkili olabileceği konusunda spekülasyon yapılmıştır [18]. Lindbo ve Dougherty, Tütün Etch Virüsü (TEV) ile yaptıkları bir çalışmada, uyarılmış direnç için iki farklı mekanizma önermişlerdir [19]. Çalışmalarında, tam uzunlukta ve eksik kılıf proteinini, kılıf proteininin antisense formunu, çerçeve kayması içerip translasyon yapılmayan kılıf proteini içeren transgenik bitkiler yapmışlardır. CPMP'de eksik kılıf protein içeren transgenik bitkilerin tam uzunlukta kılıf protein içerenlerden daha dirençli oldukları görülmüş, hatta nadiren de olsa tam bağışıklık gösterdikleri (replikasyonun hiç olmadığı durum) görülmüştür. CPMP'nin virüs parçacığının ayrılmasını engellediği veya yeni gelen virüs genomlarının yeniden kapsid proteini almasına neden olduğu ve Lu ve ark. [20] tarafından önerilmiş ve Culver [21] tarafından tanımlanmıştır. Bu, TMV model sistemine göre önerilmiştir. Bununla birlikte, bu konudaki bilgi birikimi arttıkça bu basit hipotezin transgenik bitkilerdeki patojen türevli dirençteki çeşitliliği açıklamada yetersiz kaldığı görülmüştür. Örneğin, TMV CP nin birikmesi PVX gibi heterolog virüslerde enfeksiyonu geciktirmiştir [22].

Homolog kılıf protein aracılı direnç (CP-MR) azaltılmış veya hiç sistemik enfeksiyon sağlamazken, genellikle heterolog CP türevli direnç, virüsün sistemik yayılışını engellemek ve hastalık gelişimini önlemek suretiyle düşük seviyede hetero direnç sağlamaktadır [23]. Kılıf protein aracılı direncin uygulanabilirliği sınırlı görülmektedir. Yüksek seviyedeki transgenik mRNA, transkripsiyon sonrası gen susturulmasına neden olabilir [24]. Bu yüzden, bu yöntemin genel etkinliği transgenik mRNA'nın etkin translasyonu ve protein ifade seviyesinin kararlı olmasına bağlıdır [25]. Böylece bazı bilim adamları tarafından peptid aracılı direnç önerilmiştir [26;27;28]. Bu konuda yapılan çalışmaların çokluğu nedeniyle bazı önemli ürün bitkilerinde CPMP aşağıda özetlenmiştir.

Tütün kolayca transforme edilip çoğaltılabildiğinden dolayı CPMP'nin ilk deneysel çalışması ve gösterilmesi tütün sisteminde yapılmıştır. Ayrıca tobamovirüsler en iyi karakterize edilmiş bitki virüs gurubu olup 6400 nükleotitik pozitif polariteli RNA'ya sahiptirler [29]. Tüm olgularda virüsün CP geninin ifade edilmesinin ya total bağışıklığa neden olduğu ya da semptom gelişiminin gecikmesi şeklinde direnç geliştirdiği gösterilmiştir [30]. Sanders ve ark. [31] TMV ve Domates Mozaik Virüsünün (ToMV) kılıf proteinlerini domateste ifade ettirmiş ve transgenik domates bitkilerini direnç için tarlada denemiştir. Bazı hatlar her iki virüse karşı direnç göstermesine rağmen, ToMV'ne direnç TMV ile karşılaştırıldığında daha etkili bulunmuştur. Kunik ve ark. bir çok tropik ve subtropik alanlarda domates üretimini engelleyen Sarı Yaprak Kıvrıcıklık Virüsünün (TYLCV) kılıf protein genini domateste ifade ettirmişlerdir [32]. Transgenik hatların bazıları transforme olmamışlara oranla hastalık gelişiminde bir erteleme göstermiştir. Patates Yaprak Kıvrıcıklık (PLRV) virüsünün kılıf proteini ticari bir patates çeşidi olan Desiree'ye aktarılmıştır. Transgenik patatesler hastalık gelişiminde bir erteleme şeklinde direnç göstermiştir. Transgenik bitkilerde mRNA tespit edilmesine rağmen kılıf proteini tespit edilememiştir. Transgenik hatların hiç birinde kılıf proteini tespit edilemediğinden dolayı, koruma için sadece mRNA'nın yeterli olabileceği anlaşılmaktadır. Muhtemelen transgen seçici bir şekilde tamamlayıcı (komplementer) viral RNA'ya bağlanarak replikasyonu engellemektedir. Çeltik çizgi virüsünün CP geni ile çeltik protoplazmaları transforme edilmiştir [33]. CP ifade eden transgenik hatlar inokulasyondan sonra hastalık semptomları geliştirmemiştir. Murry ve

ark. tatlı mısırın süspansiyon kültürlerini bombardıman veya elektroporasyonla, Mısır Cüce Mozaik Virüsünün (MDMV) CP'ni ifade eden fertil transgenik mısır bitkileri üretmişlerdir [34]. Çoğaltılan bitkiler MDMV ile inokule edildiğinde semptom gelişiminde bir gecikme ve CP genini ifade eden bitkilerde semptom şiddetinde bir azalma söz konusu olmuştur. Transgenik bitkiler aynı zamanda heterolog bir virüs olan Mısır Klorotik Virüsüne karşı da direnç göstermişlerdir. Bu transgenik bitkilerde virüs titerinde ciddi bir şekilde azalma gözlenmiştir. CMV'nin CP geninin ifade ettirildiği bu transgenik bütün bitkileri, bu virüsle bulaştırıldığında direnç göstermişlerdir [35]. Gonsalves ve ark. CMV'nin kılıf proteinini ifade eden transgenik bitkileri (Poinsett 76 çeşidi) bu virüse karşı dirençli bulmuşlardır [36]. Papaya Halkalı Leke Virüsünün CP genini ifade eden transgenik bitkilerde bu virüse karşı değişken seviyelerde direnç göstermişlerdir.

Arjantin Turunçgil Psorosis virüsünün 90-1-1 izolatının kılıf proteininden, kendine tamamlayıcı saç tokası (hair pin) RNA parçasının ve 54K genlerinin ifadesinin *N. benthamiana* bitkileri üzerinde direnç sağlaması, bu konstraktların turunçgil bitkilerinin transformasyonu için iyi adaylar olduğunu göstermiştir [37]. Direncin derecesi viral diziyeye bağlı olarak değişmiştir. Küçük engelleyici RNA (siRNA) birikmesinin ve seviyesinin analizi, CP geninden elde edilen konstraktın 54K genden elde edilene göre translasyon sonrası gen sessizleştirilmesini (PTGS) uyarma da daha etkin olduğunu göstermiştir. Transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesinin hedef dizi ile uyarıcı transgen dizisi arasındaki benzerliğe bağımlı olduğu, CPV4'den (CPsV'e uzak bir izolat) elde edilen dizinin CPsV karşı kullanımıyla test edilmiştir. Bu izolata karşı da CP-türemiş saç tokasının ifadesiyle etkili bir sessizleştirme (silencing) elde edilmiştir.

2.2. Replikaz yoluyla koruma

Transgenik bir bitkide bir virüse karşı replikaz protein aracılı koruma ilk defa 54 kDa replikaz genini taşıyan tütün bitkilerinde gösterilmiş ve korumanın TMV nin o irkına özgü olduğu tespit edilmiştir [38]. Koruma bağımsızlığa yakın olup viral replikasyonun azaltılmasından kaynaklandığını göstermektedir. 54 kDa luk protein, transgenik ve virus enfekteli bitkilerde hiç tespit edilmemesine rağmen, ekspresyonunun replikaz aracılı koruma için gerekli olduğu görünmektedir. Çerçeve kayması taşıyan

mutant Rep genleri transkript ve eksik protein üretmesine rağmen koruma sağlamaz [12]. Replikaz geninin uygun olmayan bir şekilde geçici ifadesi konakçıda engelleyici olabilir. Replikaz geni aracılı koruma diğer konakçı virüs kombinasyonlarında da gösterilmiştir. CMV'nin küçük bir delesyon ve çerçeve kayması mutasyonu taşıyan Rep geni inşa (konstraktı yapılmış) edilmiştir. Eksiltimiş ve defektif olan replikaz geni yinede oldukça yüksek seviyede direnç uyarmıştır [39]. Eksik replikaz genini ifade eden transgenik bitkiler CMV veya CMV RNAsı ile mekanik inokulasyona oldukça dirençli bulunmuşlardır. Defektif polipeptidin normal viral replikasyon kompleksinin oluşumunu engelleyerek direnç sağladığı farzedilmiştir [40].

N. tabacum bitkileri Tütün Rattle Virüsünün SYM izolatının (TRV) replikaz geninin 57-kDa read through domaini ile transforme edilmiştir [41]. Viral transgeni taşıyan 6 hattan dördü TRV'ye çeşitli seviyelerde direnç göstermişlerdir. 81G hattından transgenik bitkiler homolog izolatla veya RNA1 dizileri hemen hemen aynı olan TRV-PpK20 ve TRV-PLB izotlarıyla yapraktan ovma ile yapılan inokulasyona oldukça yüksek direnç göstermişlerdir. MacFarlane ve Davies Bezelye Erken Kahverengileşme Tobravirüsünün (Pea early browning tobnavirus, PEBV) 54kDa Rep proteinine analog bir dizisinin 1mg/ml saflaştırılmış virüse karşı direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir [42]. Bu direncin premature translasyona neden olan bir mutasyon tarafından bozulması 54 kDa proteinin uyarılmış dirençle ilgisinin olduğunu düşündürmüştür. Onlar PEBV'nin doğal irklarının uyarılmış direnci kırdığını da rapor etmişlerdir.

Faria ve ark. tarafından Fasulye Altın Mozaik Virüsünün (Bean Golden mosaic Virus, BGMV) nukleozit trifosfat (NTP) bağlama motifi olduğu farzedilen D262R motifinde kodon değişikliği taşıyan mutant rep geni yapılmıştır [43]. *Phaseolus vulgaris* mutant rep geni ve bar geni taşıyan bir vektörle transformasyon yapılmış ve başlangıç transformantlarından (T0) 17 tane si analiz edilmiştir. Bir hat (M1/4) glufosinat amonyuma tolerans ve virüside kısmi direnç göstermiştir. Hastalık yoğunluğu inokulasyon seviyesine bağlı olmuştur. Hıyar Meyve Kabarcıklı Mozaik virüsünün (Cucumber fruit mottle mosaic virus, CFMMV) 54kDa replikaz geni olduğu farzedilen bir gen *Agrobacterium tumefaciens* vektörüne klonlanmış ve partenokarpik bir hıyar kültürünün kotiledon

explantlarına aktarılmıştır [44]. R1 fideleri direnç açısından, semptom oluşumu, alternatif bir konakçıya geri inokulasyon ve ELISA ile CFMMV ye karşı taranmıştır. Replikaz geni taşıyan 14 R1 hattından 8 tane dirençli hat tanımlanmıştır. Aday 54-kDa replikaz geni için homozigot olan hat-144 mekanik inokulasyon, aşı inokulasyonu ve CFMMV ile bulaşık toprak ile inokulasyon sonucu CFMMV'ya karşı bağışık bulunmuştur. Ek olarak 3 tane kabakgilleri enfekte eden tobamovirüslere karşı da ciddi anlamda semptom oluşumu geciktirilmiştir.

Braun ve Hemenway, PVX virüsünün Rep geninin tam uzunluktaki veya amino ucu kısmından klonlar oluşturup bütün bitkisine aktarmışlardır. PVX'e karşı oluşturulan direncin derecesi Rep geninin farklı uzunluktaki kısımlarını ifade eden hatlara göre değişiklik göstermiştir. Kontrol bitkilerine göre Rep genini tam uzunlukta veya modifiye edilmiş bir kısmını ifade eden dirençli bitkilerde lokal lezyonlarda ve virüs birikiminde azalma gözlenmiştir. PVX için replikaz aracılı direncin kılıf proteini aracılı (CPMP) dirençten daha etkili olduğu bulunmuştur. Longstaff ve ark. PVX Rep geninin GDD motifi içerisine mutasyon sokulmuş kısımlarını ifade ettirmiş ve direnç uyaran bu motifin rolünü değerlendirmişlerdir. Değişik modifikasyonlar içeren Rep genini ifade eden bu hatlar ya tam direnç göstermiş ya da tamamen duyarlı bulunmuştur [45].

Cymbidium Halkalı Leke Virüsünün (Cymbidium ringspot virus, CyRSV) tam uzunlukta viral Rep geni *N. benthamiana* bitkilerinde ifade ettirilmiştir. Transgenik bitkiler virüs inokulasyonuna dirençli ve viral RNA inokulasyonuna bağışık bulunmuştur [46]). Replikaz aracılı koruma CMV, PVX, CyRSV ve PEBV için ekstrem seviyede etkili bulunmuş olup ticari olarak önemli bir çok ürün bitkilerinin diğer konakçı-virüs kombinasyonlarında da etkili bir kontrol için potansiyel vaat etmektedir. AIMV ve BMV virüslerinin tam uzunluktaki RNA 2 dizilerinin ifade ettirilmesi virus inokulasyonuna direnç göstermemiştir. Replikaz aracılı direncin moleküler mekanizmasını anlamak için direnç cevabını uyaran replikasyonla ilişkili proteinlerin spesifik dizileri hakkında daha fazla bilgi gereklidir.

2.3. RNA yoluyla koruma

Genel olarak eksik fonksiyonel baskılama bu teknolojinin ciddi bir sakıncası olmasına rağmen RNA kullanmak yoluyla viral gen ekspresyonunu

baskılayarak dirençli bitki elde edilmesi bir başka yoldur [47, 48]. Bu mekanizma bitkilerde, hayvanlarda ve funguslarda mRNA'nın düzenlenmesi için iyi korunmuştur. Viral enfeksiyonun kontrolü için antisens RNA'nın kullanımı birçok laboratuvar tarafından gösterilmiştir [49, 50]. Viral genomun bir kısmına tamamlayıcı RNA ifade ettirilmesi, muhtemelen RNA-DNA çifti (duplex) oluşturarak viral genomun replikasyonunu durdurduğu anlaşılmaktadır. Çift oluşumu transkripsiyon ve translasyonu baskılayabilir, transportu engelleyebilir ya da nukleik asitlerin daha hızlı dönüşümüne önderlik edebilir. Antisens RNA aracılı koruma iki basamaktan oluşur: hedef genomun sessizleştirilmesi ve küçük RNA moleküllerinin üretilmesi [15, 51]. Rapor edildiği üzere, iki tip mRNA üretilmektedir: siRNALAR ve miRNALAR. siRNA yolunda, RNA bağımlı RNA polimeraz tek veya çift iplikli RNA'ya ve parçalayıcıyı (Dicer, 21 25 nükleotide parçalayan) tespit eder [52, 53]. Bu RNALAR daha sonra ekzonukleazlar tarafından parçalanır veya PTGSleri çoğaltmak için RDR ler için primer olarak kullanılır. Parçalayıcı (Dicer) benzeri enzimler bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [54, 55]. miRNALAR tek 21 nükleotitlik iplikçikli RNALAR olup onlarda dicer tarafından kesilir [56]. Pre-miRNALARın hatalı eşleşmeden dolayı saç tokası yapıları olduğu rapor edilmiştir [57]. Daha sonra miRNA ların yapay olarak yeniden dizaynı çok sayıda virüsü hedeflemek için kullanılmıştır [58]. Tarlada belirli bir zaman diliminde birden fazla virüs bulunabilir, dolayısıyla yetiştirilen virüslerin birden fazla virüse dirençli olmaları gerekir. Yapay iki miRNA'nın eş zamanlı ifadesi iki farklı virüse karşı direnç oluşturmak için kullanılabilir.

Antisens RNA aracılı direnç birçok potyvirus için etkili bulunmuştur. RNA transkriptin birikmesi, bulaştırılan virüsün replikasyonunda seçici olarak gelen RNA'ya bağlanarak, özel bir basamağı baskılamaya yeterli olduğu görülmektedir [19]. Translasyonel olarak engellenmiş CP ile transformasyon yapılan bitkiler CP ifade eden hatlara benzer şekilde direnç göstermesi viral replikasyonun antisens RNA aracılı baskılanması yoluyla olduğunu göstermiştir [59].

Antisense transkript çekirdekte üretildiğinden, nukleusta replikasyon yapan geminivirüsler (tek iplikli DNA) antisens RNA tekniğini test etmek için uygun hedef olabilirler. Huntley ve ark. Brom Mozaik Virüsünün replikasyonunu, replikasyonun ilk basamağı olan negatif DNA iplikçığının sentezini blok

ederek bozmak için teşebbüste bulundular. Göreceli olarak daha az sayıda virüs molekülü bulunduğundan bu dönem enfeksiyondan korunmak için saldırıya açık bir dönemdir. BMV RNA 3'un genler arası bölgesinin negatif iplikle engelleyici bir ilişkiye girmesi viral replikasyonu % 90 azaltmıştır [60]. Bu yaklaşım genomik viral promotör aktivitesinin azaltulmasını içermektedir. Day ve ark. replikasyon için gerekli olan TGMV'nin AL1 genini antisens yönde ifade eden bir vektör hazırlamışlardır [61]. Virüsle inokulasyon yapılan transgenik bitkilerde kontrol grubuna göre düşük seviyede replikasyon ve semptom gelişimi görülmüştür. Bu sonuçlar antisens RNA'nın kullanımının viral enfeksiyonları azaltmada, özellikle de çekirdekte replike olanlarda ümitvar olduğunu göstermiştir.

Genetik mühendisliği yoluyla virüs direnci elde etmek için eksik (defektif) engelleyici moleküllü ve satellitler ek araçlardır. Bu çeşit RNA'lar (bazan DNA'ları da içerir) rhabdovirüsler, reovirüsler, tombusvirüsler ve gemini virüsleri de kapsayan birçok virüs grubunda bulunabilmektedir. Yardımcı virüsün replikasyonu için satellit RNA'lar gerekli olmayıp satellit RNA ile yardımcı virüsün genomu arasında homoloji yoktur. Satellit RNA'ların yardımcı virüs tarafından sebep olunan hastalığın semptomlarını, semptom şiddetini azaltıp çoğaltarak değiştirdiği gösterilmiştir [62]. Defektif viral dizileri ifade eden transgenik bitkiler genetik mühendisliği yoluyla direnç elde etmek için bir başka kaynak olabilir.

CMV'ne karşı satellitler hastalık şiddetini azaltan bir etkiye sahip olmuşlardır. CMV'nin satellit RNA'larını ifade eden transgenik domateslerin tarla testleri, transgenik olanlarda hastalık şiddetinde ciddi azalma olduğunu ve transgenik olmayanlara göre transgeniklerin %50 daha fazla ürün oluşturduğunu göstermiştir. Bununla birlikte Çin'deki tarla denemeleri SatRNA aracılı korumanın tütün ve domates bitkilerini doğal enfeksiyonlardan tamamen korumak için yeterli olmadığını göstermiştir(63).

Eksik engelleyici RNA (defective interfering RNA, DIRNA), kısaltılmış bir RNA moleküllü olup esas virüs tarafından oluşturulan semptomların yok edilmesi ile ilgili viral genomun bir kısmını temsil eder. Kollar ve ark. CyRSV'nin DIRNA'sını klonlamışlar ve *in vitro* sentezlenmiş RNA transkriptinin biyolojik olarak aktif olduğunu ve CyRSV ile eşzamanlı inokule edildiklerinde CyRSV virüsünün semptomlarını azalttığını göstermişlerdir. DIRNA ifade eden transgenik *N. bethamiana* bitkileri de CyRSV'ye direnç göstermişlerdir [64].

Genel olarak, ürünlerin korunmasında protein ve RNA aracılı direncin kullanılmasının bazı sakıncaları da vardır [65]. Bu iki mekanizmanın potansiyel riskleri şunları içerir: 1) Virüsten türetilmiş transgen ile hedef olmayan virüs arasında gerçekleşen rekombinasyonla yeni patojenler türetilir, 2) Trans enkapsidasyon (birinin diğerinin kapsidi alması) yoluyla birbirleriyle alakasız virüsler bitkiye taşınabilir, 3) Transgen tarafından üretilen ürün ile viral proteinlerin sinerjistik etki göstermesi sonucu semptomların daha da şiddetlendirilmesi söz konusu olabilir, 4) Transgenik polen yoluyla otsu akrabalara gen akışı olabilir, 5) Yeni alerjenler ve toksik proteinlerin üretimi görülebilir [46,65,66,67]. Aynı zamanda çapraz korumada zayıf süşun kullanılması, uygulanmasını sınırlandıran birçok ilişkili risk taşımaktadır: 1) Doğal vektörlerle taşındığından uygulanan alanla sınırlandırılmasının zorluğu 2) başka virüslerle sinerjizm ve rekombinasyon, 3) inokulumların hazırlanıp ürünlere uygulanmasının maliyeti bunlardan bazılarıdır[68].

Yukarıda söylenen risklerden dolayı virüs direnci için yapay mikro RNAlar (artificial microRNA, amiRNA) kullanılabilir. Bu stratejinin kullanılmasının, virüs ilişkili dsRNA'ların (double stranded RNA, çift iplikçikli RNA) ifadesinin kullanılmasıyla karşılaştırıldığında birçok avantajları vardır [69]. Kullanılan dsRNA'ların uzunluğuna bağlı olarak transgenik bitkilerde sRNA(small RNA)'ların birçok türünün ifadesi beklenilebilir ve bu sRNA'lar hedef dışı etki gösterebilir, örneğin endojen genleri etkileyebilir. Bunun aksine amiRNA yaklaşımıyla sadece bir tane kararlı küçük RNA üretilir ve onun dizisi de hedef dışı etkilerin azaltılmasına yönelik olarak seçilebilir. Buna ilaveten çapraz polinasyon sonucu oluşabilecek gen akışı dışında, amiRNA stratejisi yukarıda zikredilen tüm endişeleri en aza indirir. miRNA işlevinin yüksek bitkilerde korunmuş olmasından dolayı amiRNA stratejisi virüslere karşı ürün bitkilerinin korunması için geniş uygulanabilirliğe sahiptir. Mümkün olabilecek herhangi bir direnç kırılmasının önüne geçilmesi için virüs genomunun değişik önemli bölgelerini hedefleyen 2-3 amiRNA aynı bitkide ifade ettirilebilir. Çok sayıda uygun şekilde dizayn edilmiş amiRNAlar'ın birlikte ifade ettirilmesi ile çok çeşitli virüslere karşı geniş spektrumlu direnç başarılabilir [58]. Gelecekte çapraz koruma, protein ve mRNA aracılı korumanın mekanizması üzerine yapılabilecek yeni keşiflerin bitki virüs etkileşimlerindeki yeni

mekanizmaları çözmek ve tarlada virüs direnci için daha geliştirilmiş biyogüvenlik içeren daha etkili stratejilerin geliştirilmesi için bilgi sağlayacağına inanılmaktadır.

2.4. Ek viral gen aracılı direnç genleri

Araştırmacılar yapısal olmayan proteinleri de patojen türevli direnç amacıyla test etmişlerdir. Normal olarak viral poliprotein prosesinde işlev yapan Tütün Damar Alacalama Virüsünden (Tobacco vein mottling virus, TVMV) elde edilen potyvirus proteinazı'nın transgenik ifade edilmesi TVMV'ye karşı direnç ile sonuçlanırken diğer iki tütün potyvirusüne direnç sağlamamıştır [70]. TMV'den elde edilen eksik taşınma proteinini ifade eden bitkiler TMV veya diğer tobamovirüsler ile bulaştırıldıklarında sistemik semptom ifadesini geciktirdikleri bulunmuştur [71].

2.5. Viral olmayan gen yoluyla direnç

Sudarshana ve ark. yakın zamanda transgenik bitkilerde viral olmayan gen aracılı direnç konusunda bir derleme yayınlamışlardır. R (direnç) genleri spesifik bitki patojenlerinin tanınması için protein kodlarlar[72]. Spesifik bir R geni ile bir virus kombinasyonu arasındaki uyumsuz ilişki, enfeksiyon bölgesinin çevresindeki ilk hücrelerin programlı olarak öldürüldüğü hipersensitif reaksiyon (HR) yoluyla, viral enfeksiyonun izolasyonuyla sonuçlanır. Genellikle, dirençli bitkilerdeki böyle tepkiler virüs mücadelesi için oldukça yüksek dirençlilik durumu olan sistemik kazanılmış direnci tetikler. *N. glutinosa* da direnç geninin keşfi ve kültür tütününün ıslah programlarında kullanımı, TMV enfeksiyonunu hemen hemen elimine etmiştir. Bu tür N geni bir transgen olarak ifade edildiği zaman *N. tabacum*'un duyarlı genotiplerinde olduğu kadar domateste de dirençlilik oluşturmuştur [73,74]. N genine benzer bir şekilde Rx geni tarafından kodlanan ürünler transgenik patates, *N. benthamiana* ve *N. tabacum*'da PVX'e direnç sağlamıştır [75]. Yapısal olarak diğer R gen ürünlerine benzeyen Rx gen ürünü, virüsü HR bağımlı yöntemle sınırlar. Bununla birlikte gen ürünü hücre öldürme yeteneğine sahiptir. Direnç sağlayan çok sayıda R genlerinin varlığına rağmen, N ve Rx genleri dışında sadece Tm-22 diğer bir klonlanan virüs direnç genidir [76].

R genlerinin dışında HR'ı ilgilendirmeyen fakat virüslerin sistemik hareketlerini engelleyen transgenik direnç çeşidi de gösterilmiştir. Bitki gelişimi ve

genetiği için bir model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'nın RTM1 ve RTM2'nin gen ürünleri, jacalin zincirini, bitki lektinini ve küçük ısı şoku proteinini andırır [74,77]. Bu iki gen birlikte *A. thaliana*'da tütün etch virüsünün uzun mesafe taşınmasını sınırlar. Bununla birlikte bu genlerin transgenik dirençte kullanımı henüz gösterilmemiştir. Viral proteinlerin işlenmesinde cis ve trans işlev yapan viral proteazların gerekliliği proteaz inhibitörlerinin virüs kontrolünde kullanılabileceğini akla getirmiştir. Poliprotein işlenmesi birçok virüs arasında genel özellik olmakla birlikte, özellikle Potyviridae ve Comoviridae familyalarında çok görülür. Cysteine proteinazları engelleyen çeltik cystatin geni tütünde ifade ettirildiğinde PVY ve tütün Etch Virüsüne direnç sağlayabilmiştir [79]. Transgenik bitkilerin TMV'ye dirençli bulunmaması direncin potyviridae familyasından iki virüse özgü olduğunu göstermiştir.

2.6. Ribozom-engelleyen proteinler

Ribozom engelleyen proteinler (RIP), RNA N-glikozidazlar olup özellikle 28S rRNA'nın A4324 pozisyonundan bir purin bazının kaldırılmasına neden olurlar. Bunun sonucu olarak da substrat RNA'nın 3' ucunun ayrılmasına ve rRNA'nın, ökaryotlarda mRNA'nın translasyona katılımlına engel olurlar. Birçok kültür bitkisi tohumlarında ve diğer kısımlarında RIP biriktirirler. TMV ile eş zamanlı inokulasyon yapıldığında doğal olarak antiviral olduğu bilinen pokeweed bitkisi yaprak ekstraktı RIP grubundan Pokeweed antiviral proteini (PAP) içermektedir. PAP'ın cDNA dizisi izole edilip, klonlanıp konstitütif bir promotörün kontrolü altında aktararak PAP ifade eden transgenik patates ve domates bitkileri üretildiğinde PVX ve PVY'nin mekanik inokulasyonlarına ciddi seviyede direnç elde edilmiştir [80]. Bu bitkiler aynı zamanda mekanik olarak bulaştırılan CMV'ye de direnç göstermelerine rağmen, afit tarafından taşınan patates yaprak kıvrıcıklık virüsü ve PVY enfeksiyonlarına farklı seviyelerde direnç göstermeleri de dikkat çekmiştir. Bu bitkide PAP hücresel matrikse ihraç edilerek pokeweed ribozomları korunur. Transgenik tütünde mekanik yaralamayı takiben transgen tarafından ifade edilen PAP sitoplazmaya girerek viral RNA translasyon yapılmadan ribozomları nötralize eder ve böylece direnç başarılıdır. Bitki orijinli birçok RIP polinukleotid, N-glikozilaz olup, enginar benekli kırışıklık virüsü (Artichoke mottled crinkle virus) ve TMV'nin RNA'sı dahil, DNA ve RNA substratından adenin bazını uzaklaştırabilir ve böylece enfekteli

bitkilerin stoplazmasındaki viral RNA'yı etkileyebilir. PAP'ın C terminal delesyon mutanlığı konakçı rRNA'sını depurinasyon yapamaz fakat viral enfeksiyonu durdurma yeteneğine sahiptir [81]. Son zamanlarda PAP'ın CAP taşıyan mRNA'ları da depurine ettiği ve farklı bir antiviral karaktere sahip olduğu bulunmuştur [82]. Muhtemelen tüm RIP'ler hücrelerarası boşluğa hedeflenmemiştir ya da sitotoksik kalmaları için bu hedefleme için gerekli olan sinyal çıkartılmıştır. Böylece transgenik RIP'in virüs tarafından düzenlenen ifadesi ribozom inaktivasyonu için enfekteli hücreleri hedefleyerek virüs koruması sağlayabilir. İki parçalı geminivirüslerin AC2 gen ürünü, sağa doğru transkripsiyonun transaktivatörü olup CP'nin sırasıyla DNA-A, BV1 ve DNA-B den etkili transkripsiyonu için gereklidir. RIP (Dianthin) için cDNA *Dianthus caryophyllus*'dan izole edilip AV1'in promotörüyle birleştirildiğinde *N. benthamiana*'da Afrika Kasava Mozaik Virüsüne (African cassava mosaic virus) karşı direnç sağlamıştır [83]. Transaktivasyon yapılan RIP-aracılı direncin böcek tarafından taşınan virüslere veya onların vektörlerine etkili olup olmadığı bilinmemektedir. Sitotoksiteden dolayı bazı bitkiler etkilenirse de büyüyen bitkilerin esnekliğinden dolayı bu zarar tolere edilebilir. Bu da sekonder virüs yayılımını engellemek için iyi bir yoldur. PAP ve dianthin dışında trichosanthin, transgenik tütün de CMV ve TMV'ye karşı koruma sağlayan bir başka RIP'dir [84]. Transgenik ürünlerin geliştirilmesinde yiyeceklerde RIP varlığından dolayı tüketici endişesi önemli bir faktör olmasına rağmen, doğal RIP'lerin bitkiler aleminde yaygın olması ve buğday ve arpa gibi ürünlerin çoğunun tohumlarında RIP biriktirmesi nedeniyle endişeler mesnetsiz gibi görünmektedir.

2.7. Diğer genler

Transgenik direnç için R genleri ve RIP'ler dışında birçok başka yöntemde potansiyel taşıdığı belirtilmiştir. Bunlara örnek olarak tek zincir antitadileri (single chain antibodies, ScFv) (85, 86), ve fare 2'5' adenilat sentetazlar verilebilir [87].

2.7.1. Proteaz inhibitörleri

Poty-, tymo-, nepo-, como-, ve closterovirüsler gibi pek çok virüs gurubunun, replikasyon ve çoğalma amacıyla kendi proteinlerini işlemek için sistein proteaz aktivitesine ihtiyaçları vardır. Sistein proteaz inhibitörü ifade eden bitkiler virüs çoğalmasına direnç gösterirler. Bu fikir transgenik tütünde çeltik sistein

proteaz inhibitörü (oryzacystatin) ile potyvürüse karşı test edilmiştir. Çeltik proteaz inhibitörünü ifade eden tütün hatları TEV ve PVY enfeksiyonlarına karşı direnç için denenmiştir. Tüm test edilen transgenik hatlarda Oryzacystatin mesaj seviyesi ile papain (sistein proteaz) inhibisyonu ve TEV ve PVY direnci arasında açık ve direk bir korelasyon gözlenmiştir. Beklendiği gibi, çoğalmasında için poliprotein işlenmesine ihtiyaç duymadığından TMV enfeksiyonlarına karşı koruma gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, protein kesiminin hayat döngülerinin önemli bir parçası olduğu farklı potyvürüslere karşı proteaz inhibitörlerinin kullanılabilirliğini göstermiştir.

2.7.2. İnterferon benzeri sistemler

Yüksek omurgalılar interferon tarafından düzenlenen 2'-5' adenilat sistemi ile RNA parçalanmasını kataliz ederek virüs enfeksiyonlarına kısmi direnç gösterirler. 2'-5' adenilat sistemi iki enzimden oluşur, bunlardan 2'-5' adenilat sentetaz çift iplikli DNA'ya karşı 5' fosforlanmış 2'-5' bağlı adenilat yapar, diğeri ise 2'-5' bağımlı RNaz L'dir. Bu transgenik hatların en az TEV, TMV ve AMV gibi virüslere karşı direnç yetenekleri pozitif bulunmuştur.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Powell-Abel ve ark. tarafından CPMP'nin ilk rapor edildiğinden bu zamana kadar kısa zaman sürecinde bitkilerde genetik mühendisliği yoluyla virüslere direnç konusunda önemli gelişmeler olmuştur. Bu, viral ve nonviral genlerin kullanımını, bitki virolojisi, fizyolojisi, biyokimyası, moleküler biyolojisi gibi disiplinlerdeki güçlü temel, bilgi ve ilerlemeyi de kapsamaktadır. Özellikle CPMP için, farklı virüslere dirençli agronomik olarak önemli olan birçok ürünün transgenik hattı ya tarla testi ya da daha ileri aşamalarda. Virüs direncinin mekanizması, transgen ile virüs arasındaki moleküler ilişki, virüs replikasyonunda rol alan bitki faktörleri hakkında elde edilecek bilgiler, bitki virüslerinin kontrolü için yeni mekanizmaların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. Genetik mühendisliği, virüse özgü direnç genlerinin tanımlanmasını, izolasyonunu, sınırsız ürün çeşitlerine eşeyssel uyumluluklarına bakmaksızın ve istenilen agronomik karakterleri tehlikeye atmadan ve yoğun geri çaprazlama gerektirmeden aktarılmasını sağlamaktadır. Bu yeni teknolojinin büyük faydaları yanında virüs direnci için genetik mühendisliği ile ilgili problemler ve dezavantajlarda vardır. Bitki virüslerinin yüksek replikasyon hızlarıyla direnci

kırarak yeni ırklar geliştirmesi ihtimali bulunduğu tek gen tarafından uyarılan direncin değeri sınırlı kalabilir. Transgenik bitki üretimi sırasında seleksiyon amacıyla kullanılan işaret genleri (antibiyotik veya herbisit direnci) çevresel risk taşıyabilir. Transgenik bitki üretimi amacıyla yapılan doku kültürü sırasında uyarılan somaklonal varyasyon transformantların genetik dizilerini değiştirebilir. Bireyler arasındaki olağanüstü farklılıklar, gen ifade seviyesi ile direncin derecesi arasında korelasyonun çoğu zaman tespit edilememesi patojen türevli direnç için ortak bir model oluşturulmasını zorlaştırmıştır. Aktarılan genin sayısı ve kromozomal lokasyonu kontrol edilemez ve aktarılan genin ifadesi bireysel transformantlar arasında aynı değildir. İstenilen özellikte bir transformantın elde edilebilmesi ve aktarılan genin ifadesinin çalışılabilmesi için çok sayıda transformant elde edilmelidir. Bütün bunlara rağmen etkin ve hızla manipüle edilebilir olması nedeniyle bu çalışmada bahsedilen konuların araştırmacılar arasında yeni ufuklar açılmasına çok değerli katkılarda bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Kang, B.C et al., Genetics of plant virus resistance, *Annu Rev Phytopathol* 43:581–621,2005.
- Moreno P, et al., Plant diseases that changed the world - Citrus tristeza virus : a pathogen that changed the course of the citrus industry, *Mol Plant Pathol* 9, 251-268, 2008
- Zaitlin, M., Viral cross-protection: more understanding is need. *Phytopathology* 66,382–383,1976.
- Brommonschenkel et al.,The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi, *Mol Plant Microbe Interact* 13,1130–1138, 2000.
- Gadani, F. et al.,Genetic engineering of plants for virus resistance, *Arch Virol* 115, 1-21, 1990.
- Dasgupta, et al., Genetic engineering for virus resistance, *Current Science* 84, 341-354, 2003.
- Hamilton, R.I., Defenses triggered by previous invaders: viruses. In *Plant Disease: An advanced Treatise*. Vol.5, ed Horsfall, J.G. & Cowling, E.B.New York: Academic Press, pp.279-303, 1980.
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A., The concept of parasite-derived resistance from parasite's own genome, *Journal of Theoretical Biology* 113, 395-405, 1985.
- Palukaitis,P., & Zaitlin, M., A model to explain the "cross-protection" phenomenon shown by plant viruses and viroids. in *Plant-Microbe Interction: Molecular and Genetic Perspectives*, ed Kosuge, T., & Nester, E.W. pp 420-429, 1984.
- Powell-Abell, P., et al., Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene, *Science* 232, 738-743,1986.
- Beachy, R.N., et al., Coat protein-mediated resistance against virus infection, *Annual review of Phytopathology* 28, 451-474, 1990.
- Carr, J. P., et al., Resistance to tobacco mosaic virus induced by 54-kDa gene sequence requires expression of 54-kDa protein, *Mol. Plant Microbe Interact*, 397-404, 1992.
- Scholthof, K.B., et al., Control of Plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants, *Plant Physiology* 101, 7-12,1993.
- Lin, S.S., et al., Strategies and mechanisms of plant virus resistance, *Plant Biotechnol Rep* 1,125–134, 2007.
- Rodrigues, S.P, Biotechnological approaches for plant viruses resistance: from general to the modern RNA silencing pathway, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 795-808, 2009.
- Wilson, T.M.A, Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen derived blossoms, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90, 3134-3141,1993.
- Pang, S.Z., et al., Different mechanisms protect transgenic tobacco against tomato spotted wilt and impatiens necrotic spot tospoviruses, *BioTechnology* 11, 819-824, 1993.
- Lindbo, J.A., et al., Pathogen derived resistance to potyviruses: Working but Why?, *Seminars in Virology* 4, 369-379, 1993.
- Lu, B., et al., Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection, *Virology* 248,188–198, 1998.
- Culver, J.N., Tobacco mosaic virus assembly and disassembly: determinants in pathogenicity and resistance, *Annu Rev Phytopathol* 40, 287–308, 2002.
- Anderson, E., et al., Transgenic plants that express the coat protein genes of TMV,AIMV and AIMV interfere with disease development of some non related viruses, *Phytopathology* 79, 1284-1290, 1989.

22. Bazzini A.A., et al., Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively, *J Gen Virol* 87,1005–1012, 2006.
23. Baulcombe, D.C., Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants, *Plant Cell* 8,1833-1844, 1996.
24. Prins, M., Broad virus resistance in transgenic plants, *Trends Biotechnol* 21,373–375, 2003.
25. Rudolph, C., et al., Peptide-mediated broadspectrum plant resistance to tospoviruses, *Proc Natl Acad Sci USA* 100,4429–4434, 2003.
26. Uhrig, J.F., Response to Prins: broad virus resistance in transgenic plants, *Trends Biotechnol* 21, 376–377, 2003.
27. Lopez-Ochoa, L., et al., Peptide aptamers that bind to a geminivirus replication protein interfere with viral replication in plant cells, *J Virol* 80,5841–5853, 2006.
28. Goelet, P., et al., Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* ,79, 5818-5822, 1982.
29. Beachy R.N., Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 659–664,1999.
30. Sanders, P. R., et al., Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. *Phytopathology* 82, 683-690, 1992.
31. Kunik, T., et al., Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio/Technology* 12, 500-504,1994.
32. Hayakawa, T., et al., Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect -transmitted virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 9865-9869, 1992.
33. Murry, L.E., et al., Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein are resistant to mixed infections of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus, *Bio/Technology* 3, 403-409, 1993.
34. Namba, S., et al., Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus(CMV) strain W1 appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains, *Gene* 107, 181-188, 1991.
35. Gonsalves, D., et al., Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors, *Bio/Technology* 10, 1562-1570,1992.
36. Reyes, C.A., et al., Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes, *Plant Cell Report* 28,1817-1825, 2009.
37. Golemboski, D.B., et al., Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus, *Proceeding of Natinonal Academy of Sciences, USA* 87,6311-6315, 1990.
38. Anderson, J.M., et al., A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89, 8759-8763, 1992.
39. Braun, C. J. & Hemenway, C.L. Expression of amino-terminal portions of full length viral replicase genes in transgenic plants confer resistance to potato virus X infection, *Plant Cell* 4, 735-744, 1992.
40. Vassilakos, N., Resistance of transgenic tobacco plants incorporating the putative 57-kDa polymerase read-through gene of Tobacco rattle virus against rub-inoculated and nematode-transmitted virus, *Transgenic research* 17,929-941, 2008.
41. MacFarlane, S.A., et al., Plants transformed with a region of 201 kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 5829-5853,1992.
42. Faria, J.C., Partial resistance to Bean golden mosaic virus in a transgenic common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) line expressing a mutated rep gene, *Plant Science* 171, 565-571, 2006.
43. Gal-On A., et al., Transgenic cucumbers harboring the 54-kDa putative gene of Cucumber fruit mottle mosaic tobamovirus are highly resistant to viral infection and protect non-transgenic scions from soil infection, *Transgenic Research* 14,81-93, 2005.
44. Longstaff, M., et al., Extreme resistance to Potato virus X infection in plants expressing a modified componenet of the putative viral replicase, *EMBO Journal* 12, 379-386,1993.
45. Rubio, T., et al., Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: an overview and opinion, *Mol Plant Microbe Interact* 12, 87–92, 1999.
46. Chumakov, S.P., et al., Efficient downregulation

- of multiple mRNA targets with a single shRNA-expressing lentiviral vector, *Plasmid* 63, 143-149, 2010.
47. Lopez, C., et al., Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime, *Mol Plant Pathol* 11, 33-41, 2010.
 48. Baulcombe D.C. RNA silencing in plants, *Nature* 431,356–363, 2004.
 49. Moissiard, G., Voinnet, O., RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* 103,19593–19598, 2006.
 50. Koundal, V. and Praveen, S., MicroRNA-based RNA Interference Vector for Gene Silencing in Plants more options, *J. Plant Biochemistry and Biotechnology* 19, 79-82, 2010.
 51. Dalmay T, et al., An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus, *Cell* 101,543–553, 2000.
 52. Xie, Z., et al, Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants, *Plos Biol* 2,642–652, 2004.
 53. Akbergenov R, et al., Molecular characterization of geminivirus derived small RNAs in different plant species, *Nucleic Acids Res* 34, 462–471, 2006
 54. Deleris A, et al., Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense, *Science* 313, 68–71, 2006.
 55. Bartel D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116, 281–297, 2004.
 56. Bonnet, E., et al., The small RNA world of plants, *New Phytol* 171, 451–468, 2006.
 57. Niu, Q.W., et al., Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance, *Nat Biotech* 24,1420–1428, 2006.
 58. De Haan, P., et al., Characterization of RNA mediated resistance to tomato spotted Wilt virus in transgenic tobacco plants, *Bio-technology* 10,1133–1137,1992.
 59. Huntley, C.C., and Hall, T.C., Minus sense transcripts of brome mosaic virus RNA-3 intercistronic region interfere with viral replication, *Virology* 192, 290-297,1993.
 60. Day, et al., Expression of an antisense viral gene in transgenic plants tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus, *Proc.Natl Acad.Sci.USA* 88,6721-6725, 1991.
 61. Kaper, J.M. & Collmer, C.W.1988. Modulation of viral Plant diseases by secondary RNA agents. in *RNA Genetics*, V. III. Boca Raton:CRC Press.ed, Domingo, E., Holland,J.J & Ahlquist, P. pp 171-194.
 62. Yie, Y., & Tien , P. ,Plant virus satellite RNAs and their role in engineeringresistance to virus diseases, *Seminars in Virology* 4, 363-368, 1993.
 63. Kollar, A., et al., Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium rigspot tomosvirus in transgenic plants,*Virology* 193, 313-318, 1993.
 64. Tepfer, M., Risk assessment of virus-resistant transgenic plants, *Annu Rev Phytopathol* 40,467–491, 2002.
 65. Aaziz, R., Tepfer, M., Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants, *J Gen Virol*, 80,1339–1346, 1999.
 66. Hammond, J., et al., Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes, *Adv Virus Res* 54,189–314, 1999
 67. Gal-On A., Shibolet, Y.M. Cross-protection, In: Loebenstein G, Carr JP (eds) *Natural resistance mechanisms of plant to viruses*, Springer, Berlin, pp 261–288, 2006.
 68. Schwab, R., et al., Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis, *Plant Cell* 18,1121–1133, 2006.
 69. Maiti, I.B., et al., Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90,110-6114, 1993.
 70. Lapidot, M., et al., A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *The plant Journal* 4, 959-970, 1993.
 71. Sudarshana, M.R., et al., Methods for Engineering Resistance to Plant Viruses. In *Methods and Protocols: Plant-pathogen Interactions* (PC Ronald, Ed.) Humana Press p.183-195, 2007.
 72. Whitham, S., et al., The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor, *Cell* 78, 1101–1115,1994.
 73. Whitham, S., et al., The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, 8776–8781,1996.

74. Moffett, P., et al., Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death, *EMBO J.* 21, 4511–4519, 2002.
75. Lanfermeijer, F. C., et al., Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-22 from *Lycopersicon esculentum*, *Plant Mol Biol.* 52, 1037–1049, 2003.
76. Chisholm, S.T., et al., Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 489–494, 2000.
77. Whitham, S. A., et al., Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein, *Plant Cell* 12, 569–582, 2000.
78. Gutierrez-Campos, R., et al., The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants, *Nat. Biotechnol.* 17, 1223–1226, 1999.
79. Lodge, J. K., et al., Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7089–7093, 1993.
80. Tumer, N. E., et al., C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3866–3871, 1997.
81. Hudak, K. A., et al., Pokeweed antiviral protein binds to the cap structure of eukaryotic mRNA and depurinates the mRNA downstream of the cap. *RNA* 8, 1148–1159, 2002.
82. Hong, Y., et al., Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin in transgenic plants, *Virology* 220, 119–127, 1996.
83. Krishnan, R., et al., Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, in transgenic tobacco, *J. Biotechnol.* 97, 69–88, 2002.
84. Tavladoraki, P., et al., Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack, *Nature* 366, 469–472, 1993.
85. Franconi, R., et al., Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses, *Immunotechnology* 4, 189–201, 1999.
86. Truve, E., et al., Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthase are protected from potato virus X infection under field conditions, *Bio/Technology*