مجله ایمنی زیستی
دوره پنجم، شماره دوم، پاییز ۹۱

جنبه‌های ایمنی زیستی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس

مرضیه قنبری‌جهرمی[۱]، حسن رهنما[۲*] و امیر موسوی[۳]

۱. دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۲. هیئت علمی بخش کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.
۳. هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
hrahnama@abrii.ac.ir

چکیده

استفاده از مکانیسم‌های ایجاد مقاومت ناشی از پاتوژن، افق‌های جدیدی را در راستای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس باز کرده است. این نوع مقاومت ناشی از ویروس در گیاهان تراریخته از طریق بیان بخشی از ژنوم ویروس ایجاد می‌شود. استفاده از این فناوری در راستای تولید گیاهانی با عملکرد بالاتر سودمند به نظر می‌رسد. از طرفی گاهی ملاحظه‌هایی هم در زمینه مصرف محصولات تراریخته مطرح می‌شود. در حالی‌که توسعه استفاده از سموم و کودهای شیمیایی هم سلامت انسان و هم محیط زیست را تهدید می‌کند. بنابراین اولین گام بعد از تولید گیاه تراریخته ارزیابی مزایا و ملاحظه‌های وارد بر آن‌ها و مقایسه آن با گیاهان زراعی تولید شده در کشاورزی سنتی است. مهم‌ترین ملاحظه‌های زیست محیطی متداول در مورد تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس که تا کنون مورد بحث قرار گرفته‌اند شامل امکان تولید ویروس‌های جدید با پوشش‌گذاری نامتشابه، امکان ایجاد هم‌افزایی با دیگر ویروس‌های گیاهی و تشدید خسارت ناشی از ویروس، نوترکیبی ژنتیک بین ژنوم ویروس‌ها و گیاه تراریخته حامل ام.آر.ان.ا ویروس هدف، انتقال افقی ژن، اثر بر موجودات غیرهدف و ایمنی غذای انسان و دام هستند.

واژه‌های کلیدی: ایمنی زیستی، تراریخته، خاموشی ژن، مقاومت به ویروس، نوترکیبی.

مقدمه

در دو دهه گذشته بعد از اولین گزارش در رابطه با ایجاد مقاومت به ویروس به واسطه پروتئین پوششی (CP) خود ویروس (۳)، این دستاورد به‌طور گسترده‌ای در تولید محصولات کشاورزی مقاوم به ویروس مورد استفاده قرار گرفته است (٦، ۱۰، ٢٦ و ٢٧).

راهکارهای ایجاد مقاومت ناشی از پاتوژن[1] به‌طور کلی به دو صورت انجام می‌شود؛ یکی با تولید پروتئین و دیگری تولید آر.ان.ا. به‌طور معمول تولید پروتئین نسبت به تولید آر.ان.ا مقاومت کمتری در گیاه نسبت به ویروس ایجاد می‌کند.

روش‌های ایجاد مقاومت به ویروس

۱- مقاومت به واسطه پروتئین پوششی[2] (CP)

این پدیده اولین بار توسط شروود و فولتو در سال ۱۹۸۲ و بوان و همکاران در سال ۱۹۸۵ گزارش شد (٤ و ٣٦). مفهوم مقاومت ناشی از پاتوژن برای اولین بار توسط سانفورد و جانسون در سال ۱۹۸۵ گزارش شد و در گیاهان تراریخته توتون توسط پاول-ابل و همکاران در سال ۱۹۸٦ به اثبات رسید (۲۵ و ۳٤). در این پژوهش با بیان ژن پروتئین پوششی ویروس موزاییک توتون (TMV) بروز علایم ناشی از بیماری در توتون به تعویق افتاد. پس از آن آزمایش‌های مشابهی به سرعت انجام شد و وقوع این پدیده در ویروس‌های مختلف مثل ویروس موزاییک یونجه (AMV)، PVX و ویروس موزاییک کلم (CMV) به اثبات رسید (۲ و ۲۱).

مقاومت ناشی از پروتئین پوششی (CP) می‌تواند به‌طور گسترده یا محدودی نسبت به آر.ان.ا ویروس‌ها ایجاد شود. برای مثال پروتئین پوششی ویروس موزاییک توتون (TMV) قادر به کنترل سویه‌های نزدیک به هم ویروس موزاییک توتون است، اما با کاهش مشابهت توالی آن‌ها، مقاومت کاهش می‌یابد (۲۳). در حالی‌که ژن CP ویروس موزاییک سویا (SMV) که قابلیت آلودگی توتون را ندارد، می‌تواند باعث مقاومت توتون به دو پاتی‌ویروس متفاوت، ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) و ویروس خراشک توتون (TEV) شود (٤٠). اینکه چرا برخی از پروتئین‌های پوششی سطوح بالایی از مقاومت ایجاد می‌کنند هنوز مشخص نیست. در

[1]. Pathogen-derived resistance
[2]. Coat protein (CP) mediated resistance

مواردی که نیاز به ایجاد مقاومت وسیع و کافی باشد تراژن‌ها از چندین سویه ویروس طراحی می‌شوند که این موضوع به‌طور قطع بیان کننده ملاحظه‌های نوترکیبی ویروس‌ها است.

۲- مقاومت به واسطه توالی رپلیکازی[3] ویروس

ژن‌های کدکننده پروتئین‌های رپلیکاز ویروس می‌توانند نسبت به آلودگی ایمنی ایجاد کنند. همه ویروس‌های گیاهی دارای ژن‌های رپلیکاز هستند. تراریزش گیاهان با این روش منجر به مقاومت بسیار زیادی می‌شود که این مقاومت تنها در برابر ویروس هدف و یا سویه‌های بسیار نزدیک به هم ایجاد می‌شود (۲٤). مکانیسم‌های دخیل در مقاومت به واسطه رپلیکاز به‌خوبی شناخته نشده‌اند، اما به احتمال زیاد شامل تداخل در تکثیر ویروس و بیان ژن است.

با وجود اینکه نقش بسیار اختصاصی مقاومت به واسطه رپلیکاز استثناهایی نیز مشاهده شده است. برای مثال در یک گیاه تراریخته مقاوم به ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (PLRV) مقاومت در دامنه وسیعی از سویه‌های PLRV مشاهده می‌شود (۳۰).

۳- مقاومت به واسطه پروتئین حرکتی[4] ویروس

مقاومت به واسطه پروتئین حرکتی از طریق رقابت بین پروتئین حرکتی تولید شده از گیاه تراریخته و حمله ویروس برای یافتن مکان‌های اتصال بر روی پلاسمودسماتای گیاه میزبان ایجاد می‌شود (۲۷). بیان ژن‌های پروتئین حرکتی در مقایسه با مقاومت به واسطه رپلیکاز دامنه وسیع‌تری از ویروس‌ها را تحت اثر قرار می‌دهد. این روش به دلیل دشوار بودن بررسی بانک‌های ژنی و ساخت موتانت‌های مناسب کاربرد زیادی ندارد.

٤- مقاومت به واسطه آر.ان.ا[5]

برخی از راهکارهای مقاومت ناشی از پاتوژن ژن‌هایی را بیان می‌کنند که کدکننده پروتئین نیستند. یکی از این روش‌ها بیان توالی‌های ناهمسوی آر.ان.ا[6] به‌منظور جلوگیری از تکثیر ویروس از طریق سرکوبی آر.ان.ا[7] است (٤۸). همچنین مکانیسم‌های دیگری وجود دارند که باعث تداخل در تکثیر ویروس و یا تشکیل و تخریب آر.ان.ا دو رشته‌ای می‌شوند. بازدارندگی به واسطه توالی

[3]. Replicas- mediated resistance

[4]. Movement protein -mediated resistance
[5]. RNA-mediated resistance
[6]. Antisense RNA sequences
[7]. RNA suppression

ناهمسو دامنه محدودی از ویروس‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

مشخص شده است که مقاومت به واسطه آر.ان.ا در گیاهان تراریخته از طریق رقابت ویروس با تراژن یا نسخه آر.ان.ا آن به‌عنوان یک تله برای پروتئین‌های مورد نیاز تکثیر و حرکت ویروس عمل می‌کند. این فرآیند به صورت‌های مختلفی عمل می‌کند. در برخی موارد یک تراژن با بازدارندگی ناقص[8] (DI) در آر.ان.ا ویروس می‌تواند باعث کاهش تکثیر ویروس شود (۳۰). برای مثال بعد از حمله ویروس موزاییک زرد شلغم (TYMV) به گیاهان تراریخته با ژن 3'DI RNA ویروس TYMV، بین ژنوم گیاه و ویروس TYMV رقابت صورت می‌گیرد. آر.ان.اهای ماهواره‌ای مشابه ملکول‌های DI هستند با این تفاوت که به تشابه توالی با آر.ان.ا ویروس هدف وابسته نیستند. بررسی‌ها نشان داد که گیاهان تراریخته کدکننده آر.ان.ا DI و آر.ان.اهای ماهواره‌ای از لحاظ قابلیت در کاهش تکثیر و بهبود بیماری تا حدودی موفقیت‌آمیز بودند (۱۶، ۳۰ و ۳۹).

امروزه متداول‌ترین نوع مقاومت به واسطه آر.ان.ا سرکوبی آر.ان.ا است که این مکانیسم بر اساس تخریب پس از رونویسی آر.ان.ا[9] ویروس صورت می‌گیرد و با عنوان خاموشی ژن[10] شناخته شده است (۲). مقاومت در روش خاموشی ژن ویروس در گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس حتی بدون تولید تراپروتئین[11] در گیاه حفظ می‌شود. خاموشی ژن در مراحل اولیه رونویسی ویروس و تخریب آ.ان.ا ویروس پس از رونویسی را به ترتیب خاموشی ژن در سطح رونویسی[12] (TGS) و خاموشی ژن پس از رونویسی[13] (PTGS) می‌نامند. در هر مورد، در سلول میزبان یک مکانیسم تخریبی با پیدا کردن توالی‌های آر.ان.ا نابجا فعال می‌شود و هر دو آر.ان.ا ویروس و تراژن را تخریب می‌کند.

مکانیسم عمل PTGS بدین صورت است که پس از تشخیص آر.ان.ا هدف کمپلکس پروتئینی دایسر[14] آر.ان.اهای دو رشته‌ای را برش می‌دهد. سیگنال PTGS قابلیت پخش به صورت سیستمیک در بین سلول‌های گیاه میزبان از طریق پلاسمودسماتا و پخش از طریق سیستم آوندی دارد. اگر چه سطح

5. Defective-interfering (DI)

9. Post-transcriptional destruction
10. Gene silencing
11. Transprotein
12. Transcriptional gene silencing (TGS)
13. Post transcriptional gene silencing (PTGS)
14. Dicer

خاموشی ژن بالا است مقاومت معمولا بر علیه ویروس‌هایی عمل می‌کند که مشابه تراژن و یا با آن یکسان باشند.

خلاصه‌ای از رهاسازی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس در دو دهه اخیر

در دو دهه اخیر مفهوم مقاومت ناشی از پاتوژن به طور موفقیت آمیزی در راستای تولید محصولات تراریخته مقاوم به ویروس به کار گرفته شده است. بسیاری از این گیاهان در شرایط مزرعه ارزیابی می‌شوند و تعداد کمی از آن‌ها تجاری شده‌اند (جدول ۱). با کشف مکانیسم‌های دخیل در مقاومت افق‌های جدیدی در استفاده از مسیرهای ضدویروسی خاموشی ژن به‌عنوان مکانیسم‌های دفاعی قوی در برابر ویروس‌ها در گیاهان تراریخته باز شد. در حالی‌که تنها تعداد محدودی از محصولات تراریخته مقاوم به ویروس در دسترس کشاورزان قرار گرفته است. چرا؟ عوامل و موانع متعددی می‌تواند در عدم موفقیت این امر دخیل باشد. برای مثال الزامات قانونی ممکن است پیچیده باشد، زمان‌بر بودن، غیر عملی بودن و هزینه‌های زیاد تجاری‌سازی ایمن از دیگر دلایل ممکن هستند. همچنین متقاضیانی که به دنبال رفع ممنوعیت قانونی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس هستند، ممکن است دلسرد شده باشند. فقدان یک حکم قوی برای رساندن یک محصول به مصرف‌کننده نهایی، با وجود فواید این فناوری، یکی دیگر از فاکتورهای کلیدی است. هم‌چنین، فشار سیاسی اعمال‌شده توسط سازمان‌های غیردولتی نسبت به توسعه و رهاسازی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس یکی دیگر از فاکتورهای بسیار مهم در بسیاری از کشورها محسوب می‌شود.

ایمنی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس به‌طور گسترده‌ای در ۲۰ سال اخیر مورد ارزیابی قرار گرفته است. یکی از اهداف مهم در فعالیت‌های ایمنی زیستی فراهم آوردن یک ارزیابی واقع‌بینانه از محصولات تراریخته مقاوم به ویروس است. به این منظور، ابتدا وخیم‌ترین احتمالات خطرآفرین تصور می‌شوند و بعد آزمایش‌ها بر مبنای آن‌ها طرح می‌شوند. برای مثال بر اساس شواهد قبلی بر روی ارتباط اختصاصی بین پروتئین پوششی (CP) و پروتئین‌های کمکی[۱۵] (HC) دو

[15]. Helper component

جدول ۱- خلاصه‌ای از مهم‌ترین محصولات تراریخته مقاوم به ویروس در دنیا که در مزرعه در حال ارزیابی بوده و یا به‌طور تجاری رهاسازی شده‌اند. اطلاعات ثبت شده برگرفته از وب سایت مرکز ارزیابی خطر محیط زیست (CERA) (http://www.cera-gmc.org) است.

نام گیاه	نام علمی	نوع مقاومت به ویروس	رویدادهای تجاری‌شده	عامل ژنتیکی
غلات				
جو	*Hordeum vulgare*	Barley yellow dwarf virus (BYDY)		
کلزا	*Brassica napus*	*Turnip mosaic virus* (TMV)		
گل و گیاهان زینتی				
داوودی	*Chrysanthemum indicum*	*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)		
ارکیده	*Encyclia cochleata*	*Cymbidium mosaic virus* (CMV)		
میوه‌ها				
آلو	*Prunus domestica*	*Plum pox virus* (PPV)	C5	پروتئین پوششی
پاپایا	*Carica papaya*	*Papaya ringspot virus* (PRV)	55-/63-1 X17-2	پروتئین پوششی
لیمو ترش	*Citrus aurantifolia*	*Citrus tristeza virus* (CTV)		
علوفه				
یونجه	*Medicago sativa*	*Alfalfa mosaic virus* (AMV)		
بقولات				
لوبیا	*Phaseolus vulgaris*	*Bean golden mosaic virus*		
سویا	*Glycine max*	*Soybean mosaic virus* (SMV) *Bean pod mottle virus* *Southern bean mosaic virus*		
سبزی‌ها				
سیب‌زمینی	*Solanum tuberosum*	*Potato virus A* *Potato virus X* *Potato virus Y* *Potato leafroll virus* (PLRV) *Tobacco rattle virus* *Tobacco vein mottling virus*	RBMT15-101 SEMT15-02 SEMT15-15 RBMT21-129 RBMT21-350 RBMT22-082	پروتئین پوششی رپلیکاز (آر.ان.ا پلیمراز وابسته به آر.ان.ا (RdRp)
فلفل	*Capsicum*	*Cucumber mosaic virus* *Tobacco etch virus* *Potato virus Y*		

کدو	*Cucurbita pepo*	*Cucumber mosaic virus*	CZW-3	پروتئین پوششی
		Papaya ringspot virus		
		Squash mosaic virus		
		Watermelon mosaic virus	CZW-3 ZW20	پروتئین پوششی
		Zucchini yellow mosaic virus	CZW-3 ZW20	پروتئین پوششی
گوجه‌فرنگی	*Solanum lycopersicum*	*Beet curly top virus* *Cucumber mosaic virus* *Tobacco mosaic virus* *Tomato mosaic virus* *Tomato spotted wilt virus* *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)		

ویروس WMV و ZYMV، که باعث افزایش انتشار به واسطه شته می‌شدند، برهم‌کنش بین ویروس یک سویه قابل انتقال با شته از WMV و یک سویه غیرقابل انتقال با شته از ZYMV به منظور ارزیابی پوشش‌گذاری نامتشابه در کدو مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). در این سیستم مدل ۲ درصد پوشش‌گذاری نامتشابه به دست آمد. این درصد می‌تواند در سیستم‌های دیگری مثل PRSV و ZYMV به خاطر کمتر اختصاصی بودن CP و HC آن‌ها کمتر باشد.

یکی دیگر از ضرورت‌های اصلی در ایمنی زیستی تمرکز بیشتر بر روی عواقب یک خطر بالقوه خاص است. آگاهی از اثرهای حقیقی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس به‌صورت پژوهش‌های واقع‌بینانه در محیط‌های باز صورت می‌گیرد. تا کنون با گذشت دو دهه از معرفی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس، هیچ‌گونه گزارش علمی قابل استناد حاکی از خسارت آن‌ها به محیط زیست ثبت نشده است. همچنین یک گزارش از تاریخچه ایمنی مصرف تجاری محصولات پاپایا و کدوی مقاوم به ویروس در ایالت متحده آمریکا وجود دارد. بر اساس شواهد آزمون‌های مزرعه‌ای و رهاسازی تجاری محصولات نشان دادند که فواید حاصل از آن‌ها از خطرها مهم‌تر بوده و گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس برای محیط زیست و مصرف‌کننده‌ها ایمنی دارند.

اهمیت بررسی جنبه‌های ایمنی زیستی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس

مکانیسم عمل مقاومت به ویروس به واسطه پروتئین پوششی (CP) به این صورت

است که تولید و تجمع پروتئین پوششی می‌تواند به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث ایجاد تداخل در تجمع ویروس، تکثیر و حرکت در فواصل طولانی و سلول به سلول ویروس شود (۳). اگرچه این مکانیسم در برخی موارد اختصاصی عمل می‌کند، بعدها مشخص شد که افزایش بیان ژن پروتئین پوششی ویروس می‌تواند منجر به تخریب آر.ان.ا ویروس در یک مسیر غیر وابسته به تجمع پروتئین شود (۲۰). کشف این مکانیسم، که امروزه به نام خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) شناخته می‌شود، راه جدیدی را در عرصه پژوهش و علم زیست‌شناسی معاصر گشوده است (۴۲، ٤٤، ٤٥ و ٤٦). القای دائمی PTGS از طریق CP و یا بقیه بخش‌های ژنوم ویروس می‌تواند منجر به تخریب آر.ان.ا ویروس شود که در حال حاضر به طور گسترده‌ای در ایجاد مقاومت به ویروس استفاده می‌شود. با افزایش کاربرد این روش در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس ملاحظه‌هایی در مورد احتمال تولید پروتئین پوششی در گیاه افزایش یافت. همزمان با انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای متعدد بر روی توالی‌های مختلف ویروسی، پژوهش‌هایی با هدف ایجاد مقاومت به ویروس با استفاده از توالی‌های غیر ویروسی انجام شد. اگر چه استفاده از توالی‌های غیر ویروسی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌تواند تا حدودی ملاحظه‌های اکولوژیک را کم کند ولی مشخص شده است که مقاومت به ویروس در شرایط مزرعه به ندرت ایجاد می‌شود (۳۲). بررسی لاین‌های مختلف تراریخته سیب‌زمینی مقاوم به ویروس PVY نشان داد که این گیاهان در مقایسه با رقم غیر تراریخته اسپونتا[16] از لحاظ ویژگی‌های زراعی و ترکیبات بیوشیمیایی تفاوت معنی‌داری نداشتند (٦). به طور کلی نگرانی‌های زیست محیطی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس را می‌توان بر اساس اینکه آیا ژنوم تحت اثر برهم‌کنش ویروس-میزبان قرار می‌گیرد یا نه به دو دسته تقسیم کرد. گروه اول شامل همه موقعیت‌هایی است که در آن فنوتیپ تحت اثر برهم‌کنش ویروس-گیاه تغییر کرده ولی ژنوتیپ هیچکدام تغییر نمی‌کند. این گروه شامل انواع مختلف مکمل‌سازی[17]، پوشش‌گذاری نامتشابه[18] و هم‌افزایی[19] با دیگر ویروس‌های

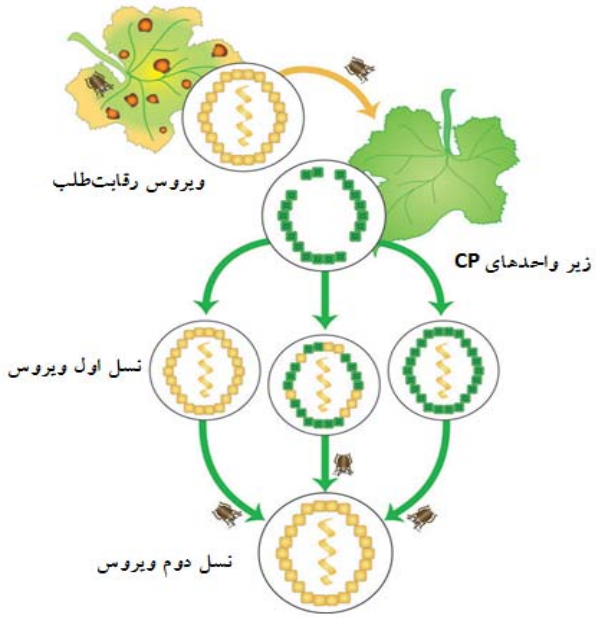
[16]. Spunta
[17]. Complementation
[18]. Heterologous encapsidation
[19]. Synergy

گیاهی و تشدید آلودگی هستند. این تغییرات فنوتیپی می‌توانند برگشت‌پذیر باشند. گروه دوم با ایجاد تغییرات ژنتیک در گیاه و یا ویروس منجر به خطرهای بالقوه‌ای می‌شود. این گروه شامل شار ژنی از گیاهی به گیاه دیگر از طریق دگرگشنی و شار ژنی از گیاه به ویروس از طریق نوترکیبی است. به‌طور معمول تغییرات ژنوتیپی مهم‌تر هستند چرا که این نوع تغییرات برگشت‌ناپذیرند. اثر بر موجودات غیرهدف و ایمنی غذای انسان و علوفه نیز از مباحث مهم در ارزیابی خطر هستند.

۱- خطرهای بالقوه ناشی از تغییرات فنوتیپی

۱-۱- مکمل‌سازی ویروس‌ها (کمک به حرکت ویروس، تشخیص بافت و دامنه میزبان)

ویروس‌شناسان بعد از تولید اولین گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس به بررسی برهم‌کنش بین گیاه و ویروس در قالب آزمون‌های مکمل‌سازی پرداختند. بررسی بر روی گیاهان توتون تراریخته مقاوم به ویروس TMV نشان داد که ژن *CP* در گیاه تراریخته می‌تواند طی عمل مکمل‌سازی باعث فعال شدن یک سویه TMV که ژن *CP* آن غیرفعال است شود (۲۵). متعاقبا پژوهش‌های متعددی با آزمایش‌های مکمل‌سازی بر روی پروتئین‌های کدکننده ویروسی که در حرکت سلول به سلول، حرکت در مسافت طویل و شناسایی بافت هدف نقش دارند انجام شد (۷ و ۱۷). ملاحظه‌های دیگری در رابطه با اینکه آیا بیان ژن *CP* در گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس منجر به اشتباه در علایم، تغییر در اختصاصی بودن بافت و یا ایجاد حساسیت به یک ویروس در یک گیاه که در حالت طبیعی میزبان آن نیست، می‌شود یاخیر به وجود آمد. اگر چه بعدها ثابت شد که این ملاحظه‌ها بی‌اساس است اما این امکان همچنان وجود دارد. با وجود این احتمالات، این گونه اثرهای نامطلوب می‌تواند به‌طور نسبی در توسعه گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس مورد توجه قرار گرفته و در بدترین حالت، منجر به جلوگیری از انتقال ژن‌های مقاومت به ویروس شود و یا در صورت امکان با تغییر ژن مقاومت به ویروس از مکمل‌سازی جلوگیری شود، به طوریکه توانایی ایجاد مقاومت در گیاه تراریخته حفظ شود.



شکل ۱- نمای پوشش‌گذاری نامتشابه. در طبیعت یک حشره ناقل می‌تواند یک ویروس (ویروس رقابت‌طلب) را از یک گیاه آلوده شده گرفته و به یک گیاه تراریخت بیان‌کننده ژن پروتئین پوششی (CP) منتقل کند. ویروس رقابت طلب در حین تکثیر و ترجمه اجزا می‌تواند یا توسط پروتئین پوششی (CP) خود ویروس و یا CP کدشونده توسط تراژن پوشش‌گذاری شود. پوشش‌گذاری می‌تواند به طور بخشی و یا کامل (در نسل اول ویروس) انجام شود. ویروس‌های جدید می‌توانند توسط یک حشره ناقل جذب شده و انتقال یابند. باید توجه داشت که نسل دوم ویروس شبیه به ویروس رقابت‌طلب خواهد شد (۱۲).

۱-۲- امکان ایجاد ویروس‌های جدید با پوشش‌گذاری نا متشابه (Heterologous encapsidation)

یکی از ملاحظه‌ها در رابطه با تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس ایجاد ویروس‌های جدید با پروتئین پوششی نامتشابه است. برای اولین بار در دهه ۱۹۷۰ زمانی‌که گیاهان با دو ویروس هم‌خانواده آلوده شدند، برای مثال دو تئو ویروس[20] (۳۳) و یا دو پاتی‌ویروس[21] (۵)، اشکال متفاوتی از پوشش‌گذاری نامتشابه مشاهده شد، به این معنی که آر.ان.ا یک ویروس می‌تواند در بخش‌هایی از خود که با CP ویروس دیگر به‌طور کامل و یا به‌صورت بخشی ترکیب شده است، پوشش‌گذاری کند (شکل ۱). CP یک عامل مهم تعیین کننده در انتقال ویروس توسط ناقل است. تغییر در نوع

[20] . Teoviruses
[21] . Potyviruses

ناقل اختصاصی ویروس زمانی مشاهده شد که یک گیاه غیر تراریخته توسط دو ویروس هم‌خانواده که توانایی پوشش‌گذاری نامتشابه دارند و توسط دو گونه شته انتقال پیدا می‌کند، آلوده شدند. بعد از آلودگی نوع ناقل اختصاصی آن‌ها تغییر پیدا کرد. برای مثال پس از آلودگی گیاهان تراریخته حامل ژن *CP* ویروس پاکس نخل[22] (PPV) با یک سویه ویروسی که قابل انتقال با شته نیست، ویروس موزاییک زرد کدو[23] (ZYMV-NAT)، پوشش‌گذاری نامتشابه اتفاق افتاد و در نتیجه ویروس ZYMV-NAT قابلیت انتقال با شته را پیدا کرد (۱۹).

پژوهشگران تلاش‌های بسیاری به‌منظور کاهش یا حذف خطرهای وقوع این پدیده کرده‌اند. از جمله اینکه از طریق دستکاری ژن‌های کدکننده پروتئین پوششی علاوه بر ایجاد مقاومت امکان تغییر و برهم‌کنش با ژنوم موجود ناقل از بین می‌رود (۲۲). برای مثال سویه‌های آزمایشگاهی از ویروس CMV تولید شدند که با ایجاد جهش در ژن *CP* آن‌ها قابلیت انتقال با شته را از دست داده‌اند. بنابراین با بیان این تراژن، CMV CP در گیاه علاوه بر ایجاد مقاومت به ویروس، ویژگی پوشش‌گذاری نامتشابه بروز نمی‌کند (۱۳). بررسی‌ها بر روی چندین نوع پاتی ویروس از لحاظ ویژگی غیر قابل انتقال بودن توسط شته در سویه‌های آزمایشگاهی نشان داد که ترکیب آسپارتیت- آلانین- گلایسین (DAG) در بخش N-ترمینال CP برای انتقال توسط شته ضروری است (۱). بنابراین پژوهش‌های مختلف نشان دادند که می‌توان با حذف ترکیب DAG و یا انتهای بخش N- ترمینال، ویژگی انتقال با شته را حذف کرده در حالی‌که ایجاد مقاومت توسط ژن *CP* حفظ می‌شود (۱۵، ۳۷). بنابراین، بیان ژن *CP* غیر قابل ترجمه در ایجاد مقاومت بر اساس مکانیسم خاموشی پس از رونویسی (PTGS) از لحاظ ایمنی زیستی مطلوب به نظر می‌رسد چرا که علاوه بر جلوگیری از تجمع پروتئین پوششی CP، احتمال القای قابلیت انتقال با شته از طریق پوشش‌گذاری نامتشابه برطرف می‌شود (٤١).

۱-۳- امکان ایجاد هم‌افزایی (Synergism) با دیگر ویروس‌های گیاهی و تشدید آلودگی

در برخی موارد وقتی گیاهان با بیش از یک

[22]. *Plum pox virus*
[23]. *Zucchini yellow mosaic virus*

ویروس آلوده می‌شوند، برهم‌کنش بین آن‌ها منجر به افزایش علایم خسارت ویروس می‌شود. علت این پدیده ناشناخته که در گذشته هم‌افزایی نامیده شد، نوعی مکمل‌سازی گزارش شد. پژوهش‌های جدید نشان دادند که برخی از انواع هم‌افزایی بر مبنای مکمل‌سازی نیست. اولین مثال هم‌افزایی برهم‌کنش بین ویروس PVX و PVY بود (٤٣). مشخص شد که آنزیم کمک کننده پروتئاز[۲۴] (HC-Pro) در پاتی‌ویروس‌ها با ایجاد تداخل در سیستم مقاومت طبیعی گیاه شبیه نوعی خاموشی پس از رونویسی، باعث پدیده هم‌افزایی می‌شود (۲۸).

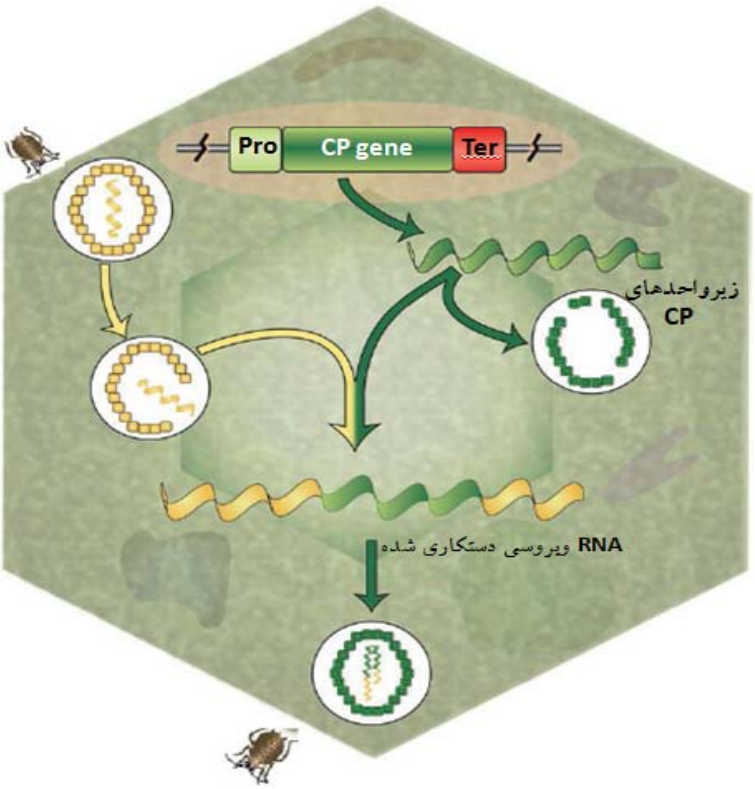
۲- خطرهای بالقوه ناشی از نوترکیبی ژنتیک

۲-۱- انتقال افقی ژن و اثر بر گیاهان وحشی

شار ژنی بین گیاهان زراعی و گونه‌های وحشی هم‌خانواده آن‌ها از آغاز اهلی شدن محصولات اتفاق افتاده و هنوز هم بین همه گونه‌های زراعی و گونه‌های وحشی هم‌خانواده که با هم سازگاری ژنتیک دارند اتفاق می‌افتد. اگر چه این پدیده از مدت‌ها پیش شناخته شده است، ولی هنوز هم اثر شار ژنی از محصولات زراعی به گونه‌های وحشی مورد بحث و بررسی است. کاهش تنوع زیستی در جمعیت‌های گیاهی که گونه‌های وحشی کمتری دارند خطرناک‌تر است و می‌تواند باعث انقراض جمعیت‌های خاصی از گیاهان وحشی شود. تا کنون آزمایش‌های مزرعه‌ای گسترده‌ای در رابطه با انتقال تراژن‌های مقاومت به ویروس از گیاهی به گیاه دیگر انجام شده است. شناسایی و بررسی گونه‌های گیاهی وحشی، قرابت بین گونه‌ای، نحوه گرده‌افشانی و پراکنش گونه‌های مختلف همگی از مبانی اصلی بررسی انتقال افقی ژن است (۱۲). به منظور بررسی امکان شار ژنی بین لاین‌های سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به ویروس PVY و گیاه وحشی *Solanum chacoense* هم‌خانواده با آن آزمایشی صورت گرفت (٦). بر اساس نتایج هیچ تلاقی بین‌گونه‌ای ثبت نشد و احتمال وقوع این پدید بسیار پایین گزارش شد.

تلاقی بین گونه‌ای همواره به طور معمول در طبیعت اتفاق می‌افتد. عواقب ناشی از تلاقی گیاهان تراریخته در مقایسه با تلاقی

[24]. Helper-component-protease



شکل ۲- تصویر شماتیک از نوترکیبی. به طور طبیعی یک حشره ناقل می‌تواند یک ویروس را به یک گیاه تراریخت بیان‌کننده ژن *CP* به همراه یک پیشبر (Pro) و یک خاتمه‌دهنده (Ter) منتقل کند. ژنوم ویروس در گیاه می‌تواند تکثیر شود. اگر در حین همانندسازی بین نسخه‌های تراژن و آر.ان.ا ویروس تغییر الگو اتفاق بیفتد، باعث تولید یک مولکول آر.ان.ا شیمری (آر.ان.ا ویروسی دستکاری شده) خواهد شد. این آر.ان.ا جدید پس از پوشش‌گذاری قابلیت انتقال توسط حشره ناقل بعدی را خواهد داشت (۱۲).

گیاهان غیر تراریخته تنها زمانی تفاوت خواهد داشت که تراژن کدکننده صفت مورد نظر در مخازن ژنتیک آن جمعیت دیده نشده باشد. اگر صفت مورد نظر یک ویژگی مفید انتخابی باشد، انتظار می‌رود که شیوع آن در جمعیت‌های وحشی به‌طور تصاعدی افزایش یابد. در نتیجه علاوه بر افزایش جمعیت علف‌های هرز، ویژگی علف‌هرز بودن[۲۵] در گونه‌های مختلف با رشد گیاهان در مکان‌های نامطلوب افزایش پیدا می‌کند. البته این پدیده در مورد ویژگی‌هایی صدق می‌کند که تعیین‌کننده اندازه جمعیت علف‌های هرز هستند مثل کاهش کیفیت گیاه‌خواری و یا

[25]. Invasiveness/weediness

حساسیت جوانه‌زنی علف‌های هرز به یک نوع قارچ. بنابراین به نظر می‌رسد که ورود یک ژن مقاومت به ویروس در جمعیت‌های وحشی نه اثری بر اندازه جمعیت‌های علف‌های هرز خواهد داشت و نه ویژگی علف‌هرز بودن را افزایش خواهد داد (٤١). در مورد گونه‌های *Brassica* در انگلستان مشخص شده است که اگرچه آلودگی به ویروس اثر بسیار منفی در کیفیت گیاه دارد، اما اگر گونه‌های وحشی *Brassica* یک ژن مقاومت به ویروس دریافت کنند، بعید به نظر می‌رسد که اثری بر اندازه جمعیت آن‌ها داشته باشد (۲۹).

۲-۲- انتقال افقی ژن از گیاه به ویروس

نوترکیبی در ویروس‌ها ممکن است باعث تولید سویه‌های جدید با فنوتیپ جدید شود (۳۸،۳۵). نوترکیبی به دو صورت می‌تواند روی دهد.

۱- نوترکیبی بین دو ویروس مشابه که همزمان یک گیاه غیر تراریخته را آلوده کرده‌اند. ۲- نوترکیبی بین یک ویروس خارجی و یک گیاه تراریختی که ام.آر.ان.ا حامل توالی‌های مورد نظر در ویروس هدف را بیان می‌کند (شکل ۲). به نظر می‌رسد که نوترکیبی آر.ان.ا ویروس در حین تکثیر ژنوم ویروس با فعالیت آر.ان.ا پلیمرازهای وابسته به آر.ان.ا[۲۶] (RdRp) در گیاه اتفاق می‌افتد.

به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد که بیشترین خطر توسعه گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس، مربوط به نوترکیبی بین ام.آر.ان.ا تراژن ویروسی و آر.ان.ا ژنومی یک ویروس غیر هدف باشد (۱۱). در سال‌های اخیر در آزمایشی در مورد کوکوموویروس‌ها مشخص شد که پس از آلوده‌سازی همزمان گیاهان تراریخته بیان کننده ژن CMV CP با یک کوکوموویروس و گیاهان غیر تراریخته با دو نوع کوکوموویروس، جمعیت‌های مشابهی از ویروس‌های نوترکیب تولید شدند. مقایسه انواع ویروس‌های نوترکیب تولید شده در گیاهان تراریخته با گیاهان غیر تراریخته پس از دو بار آلوده‌سازی تفاوتی نشان نداد. این نتایج تا حدودی ملاحظه‌های نوترکیبی گیاهان تراریخته بیان کننده توالی‌های ویروسی را کاهش می‌دهد (۲۷).

۳- اثر بر موجودات غیر هدف

محصولات تراریخته مقاوم به ویروس

[26]. RNA dependent RNA polymerase

می‌توانند به‌طور بالقوه تنوع و پویایی موجودات غیر هدف مثل حشرات ناقل را تحت اثر قرار دهند. همچنین ژن‌های ویروسی که باعث ایجاد مقاومت در گیاهان تراریخته می‌شوند، می‌توانند با وقوع پدیده انتقال افقی ژن به میکروارگانیسم‌های خاک مثل باکتری و قارچ انتقال پیدا کنند. اگر چه این گونه پدیده‌ها خطر به نظر می‌رسند، اما احتمال وقوع آن‌ها بسیار پایین است. برای مثال هیچ تفاوت معنی‌داری در تنوع و تحرک حشرات ناقل ویروس که بر روی درختان آلوی غیر تراریخته و تراریخته حاوی ژن PPV CP نشسته بودند، مشاهده شد (۸). همچنین درختان مقاوم به PRSV پاپایا هیچ اثر قابل توجهی بر تعداد کل و تنوع اکتینومایست‌ها در لایه‌های مختلف خاک نداشتند (١٤). به‌طور کلی بر اساس شواهد تا کنون محصولات مقاوم به ویروس خطری برای موجودات غیر هدف نداشته‌اند.

٤- ایمنی غذایی و حساسیت

یکی از مباحث مهم ایمنی غذایی اثر حساسیت غذایی بر سلامت انسان و دام است. بنابراین بررسی ویژگی حساسیت‌زایی پروتئین‌های کد شونده در توالی‌های ویروسی که در گیاهان تراریخته بیان می‌شوند، ضروری به نظر می‌رسد. محصولات پروتئینی ناشی از تراژن‌های ویروسی ممکن است از توالی‌های آمینواسیدی تشکیل شده باشند که به عنوان اپیتوپ‌های خطی اتصال-E ایمونوگلوبولین پروتئین‌های حساسیت‌زا شناخته شده‌اند (۱۲). بنابراین، می‌توانند منجر به تولید حساسیت‌های جدید غذایی، تماسی و یا تنفسی شوند و یا باعث تغییر سطح یا طبیعت عوامل حساسیت‌زای طبیعی شوند.

شواهد مختلف نشان می‌دهد که یک پروتئین ویروسی در گیاهان تراریخته از لحاظ ایمنی‌شناختی باعث حساسیت نمی‌شود. جالب توجه است که در برخی موارد، گیاهان آلوده به ویروس که علایم بیماری را نشان نمی‌دهند بعد از تبدیل به غذا خورده می‌شوند. همچنین در برزیل به‌منظور بررسی و ایجاد مقاومت به ویروس تریستیزا هر ساله میلیون‌ها درخت مرکبات با یک سویه خفیف ویروس آلوده‌سازی می‌شوند، ولی هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر ایجاد خطر برای انسان منتشر نشده است (۹). به‌طور مشابه، هیچ نوع بیماری حاصل از مصرف میوه‌های برداشت شده از

هزاران درخت پاپایا که با یک سویه خفیف PRSV آلوده‌سازی شده بودند مشاهده نشد (٤٧). همچنین تا کنون هیچ‌گونه گزارش علمی مستند مبنی بر حساسیت‌زایی پروتئین پوششی (CP) ویروس گیاهی وجود ندارد. با این حال، بررسی جنبه‌های ایمنی غذایی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس از روی احتیاط لازم به نظر می‌رسد.

خاموشی پس از رونویسی ژن (PTGS)؛ مکانیسمی امید بخش از لحاظ ایمنی زیستی

پژوهش‌های مختلف در سال‌های اخیر نشان دادند که بیان ژن پروتئین پوششی[۲۷] ویروس می‌تواند به علت تولید و تجمع پروتئین پوششی در گیاه و یا به علت اثرهای القایی حاصل از ام.آر.ان.ا خود تراژن باشد. اثرهای القایی حاصل از ام.آر.ان.ا خود تراژن باعث ایجاد مقاومت به واسطه مکانیسم‌های خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS) می‌شود. بحث‌های قابل توجهی در مورد ویژگی‌های نسبی این دو نوع مقاومت وجود دارد. مقاومت به واسطه PTGS مزایای بالقوه‌ای هم از لحاظ افزایش عملکرد و هم از دیدگاه ایمنی زیستی دارد. در بیشتر موارد مقاومت در گیاه با القای ایمنی[۲۸] ایجاد می‌شود، بنابراین تجمع آر.ان.ا و یا پروتئین به مقدار کم انجام شده و یا اصلا صورت نمی‌گیرد، در نتیجه به‌طور اساسی مشکلی در رابطه با تولید ویروس‌های جدید با پروتئین پوششی غیرمشابه[۲۹]، بوجود نمی‌آید. چرا که نوترکیبی بین ام.آر.ان.ا کد کننده تراژن و آر.ان.ا ویروسی بعید به نظر می‌رسد. در ویروس‌های گیاهی پروتئین‌هایی وجود دارند که می‌توانند در PTGS مداخله ایجاد کنند. بنابراین این احتمال وجود دارد که آلودگی گیاه به یک ویروس غیر هدف می‌تواند منجر به شکستن مقاومت شود. در مواردی که یک ام.آر.ان.ا بتواند تشکیل ساختار سنجاق سری بدهد علاوه بر اینکه مقاومت بیشتری در گیاه ایجاد می‌کند، نسبت به شکستن مقاومت در نتیجه تداخل در PTGS توسط ویروس‌های غیر هدف حساسیت کمتری نشان می‌دهد.

پیشنهادات

یک دلیل مهم برای سرمایه‌گذاری بر روی پژوهش‌های ارزیابی خطر بدست آوردن

[27]. Coat protein

[28]. Immunity

[29]. Heterologous coat protein

اطلاعات کافی است تا مقامات دولتی بتوانند چارچوب‌های قانونی مناسبی برای گیاهان تراریخته وضع کنند. پژوهش‌های ایمنی‌شناسی نشان می‌دهند که برخی از خطرهای مورد ارزیابی قابل چشم‌پوشی هستند.

بر اساس شواهد پوشش‌گذاری نامتشابه و نوترکیبی بین تراژن‌های ویروسی گیاهان تراریخته در رقابت با ویروس‌ها خطرهای واقعی نیستند و می‌توان اهمیت آن‌ها کمتر در نظر گرفته شود و یا در زمان ارزیابی گیاهان مقاوم به ویروس چشم‌پوشی کرد. همچنین، حساسیت‌زا بودن پروتئین‌های پوششی را می‌توان به حداقل رساند چرا؟ بر اساس شواهد مردمی که از میوه‌ها و سبزیجات آلوده به ویروس بدون علایم ظاهری برای مدت طولانی تغذیه کرده بودند، بیماری خاصی نشان ندادند. علاوه‌بر این، چون مکانیسم مقاومت به ویروس با استفاده از پروتئین پوششی و دیگر ژن‌های ویروسی بر مبنای خاموشی پس از رونویسی (PTGS) عمل می‌کند، گیاهان مقاوم پروتئین تولید نخواهند کرد و یا به مقدار کم تولید خواهند کرد و نسخه‌های تراژن موجود در آن‌ها با گیاهان آلوده به ویروس برابری می‌کند. به منظور بررسی حساسیت‌زایی پروتئین پوششی یک ویروس می‌توان با توالی‌یابی پروتئین پوششی با استفاده از یک نرم‌افزار بیوانفورماتیک قابل قبول و یا دیگر معیارها این سوال را برطرف کرد. اگر بین توالی آمینو اسیدهای پروتئین پوششی با یک پروتئین حساسیت‌زای شناخته شده هومولوژی قابل توجهی وجود نداشته باشد حساسیت در نظر گرفته نمی‌شود.

اگرچه هر کشوری سرانجام چارچوب‌های قانونی خودش را تعیین می‌کند، به نظر می‌رسد که خطرهایی مثل پوشش‌گذاری نامتشابه و نوترکیبی می‌توانند از قوانین ایمنی حذف شوند و یا کمتر در نظر گرفته شوند. ساده‌تر کردن این مسایل می‌تواند باعث کاهش هزینه و وقت در رهاسازی گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس شود. علاوه بر این در مورد حساسیت‌زا بودن پروتئین پوششی ویروس در شرایطی که میوه‌های آلوده به ویروس هدف به‌طور معمول مصرف می‌شوند، دیگر نیازی به بررسی حساسیت‌زا بودن پروتئین پوششی نیست. همچنین به نظر می‌رسد در مواردی که بر اساس بررسی‌های بیوانفورماتیک توالی پروتئین پوششی یک ویروس هومولوژی قابل توجهی با پروتئین‌های حساسیت‌زا ندارند،

ارزیابی ایمنی پروتئین الزامی ندارد.

این در حالی است که، خطر شار ژنی باید به طور موردی در گونه‌های مختلف گیاهی بررسی شوند. این واقعیت که آیا ژن پروتئین پوششی ویروس می‌تواند باعث ایجاد مقاومت در بقیه گونه‌های گیاهی شود و ممکن است تلاقی‌های متفاوت بین‌گونه‌ای ایجاد ویژگی‌های ابر علف‌هرز شدن و از دست رفتن ذخایر ژنتیک شوند، باید از لحاظ ایمنی زیستی مورد ارزیابی قرار گیرد.

به‌طور کلی ویروس‌ها نقش مهمی در کاهش عملکرد و تولید محصول دارند. به منظور کاهش ضایعات ناشی از ویروس در محصولات کشاورزی امروزه در دنیا پژوهش‌های متعددی در راستای توسعه استراتژی‌های نوین کنترل پایدار انجام می‌شوند. بدین جهت توسعه سریع محصولات تراریخته مقاوم به ویروس که فواید زیادی برای تولیدکننده‌ها و مصرف‌کننده‌ها دارند، پس از ارزیابی‌های ایمنی ضروری است. بنابراین، پژوهش‌های ارزیابی خطر باید واقع‌بینانه باشند، تا بتواند اعتبارات قانونی لازم را برای صدور مجوز ایمنی محصولات و رهاسازی به موقع آن‌ها را فراهم کنند.

نتیجه‌گیری

از مهم‌ترین ملاحظه‌ها در مورد گیاهان تراریخته این است که آیا آن‌ها برای سلامتی انسان و محیط زیست خطری دارند یا خیر. پژوهشگران، به‌نژادگران و کشاورزان استفاده از گیاهان تراریخته را یک دستاورد مفید در مقایسه با اصلاح سنتی گیاهان زراعی می‌دانند. یکی از مشکلات کشاورزی نوین با توجه به رشد روزافزون جمعیت ایجاد تعادل بین نیاز و تولید غذای بیشتر با وظیفه حمایت از محیط زیست است. با دستکاری ژنتیک می‌توان به گیاهانی با عملکرد بالاتر دست یافت. از طرفی برخی از مصرف کنندگان استفاده از محصولات تراریخته را خطرناک و غیر اخلاقی می‌دانند. در حالی‌که توسعه استفاده از سموم و کودهای شیمیایی و دیگر فناوری‌ها در کشاورزی توسعه یافته مدرن امروز هم سلامت انسان و هم محیط زیست را تهدید می‌کند. بنابراین اولین گام بعد از تولید گیاه تراریخته ارزیابی مزایا و خطرهای احتمالی و همچنین مقایسه آن‌ها با گیاهان زراعی تولید شده در کشاورزی سنتی است.

امروزه استفاده از دانش بیوتکنولوژی به دلیل وجود فواید بسیار در کنار ملاحظه‌های

زیست محیطی مورد چالش قرار گرفته است. به طور کلی بشر همیشه سعی بر ایجاد توازن در شانس دستیابی به موفقیت در مقابل خطر شکست خوردن دارد. ایجاد تعادل بین ملاحظه‌ها و فواید فناوری‌های نو همیشه آسان نیست، بنابراین در این راستا شناسایی و معرفی فواید و ملاحظه‌های احتمالی برای انسان و محیط زیست به‌عنوان اولین گام ضروری به نظر می‌رسد.

منابع مورد استفاده

References

1. Atreya P.L., Atreya C.D., Pirone T.P. (1991). Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7887–91.
2. Baulcombe D.C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. Plant Cell 8:1833-44.
3. Beachy R.N., Loesch-Fries S., Tumer N.E. (1990). Coat proteinmediated resistance against virus infection. Annu Rev Phytopathol. 28:451–474.
4. Bevan M.W., Mason S.E., Goelet P. (1985). Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a *cauliflower mosaic virus* promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. EMBO J. 4: 1921-26
5. Bourdin D., Lecoq H. (1991). Evidence that heteroencapsidation between two *potyviruses* is involved in aphid transmission of a non-transmissible isolate from mixed infections. Phytopathology. 81:1459–64.
6. Bravo-Almonacid F., Rudoy V., Welin B., Segretin M.E., Bedogni M.C., Stolowicz F., Criscuolo M., Foti M., Gomez M., Lopez M., Serino G., Cabral S., Santos C.D., Huarte M., Mentaberry A. (2012). Field testing, gene flow assessment and pre-commercial studies on transgenic *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* (cv. Spunta) selected for PVY resistance in Argentina. Transgenic Res. 21:967–982.
7. Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., Lommel S.A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 39:419–60.
8. Capote N., Perez-Panad´es J., Monz´o C., Carbonell E.A., Urbaneja A. (2007). Risk assessment of the field release of transgenic European plums carrying the coat protein gene of *Plum pox virus* under Mediterranean conditions. Trans. Res. 38-41.
9. Costa A.S., Muller G.W. (1980). Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. Plant Dis. 64:538–41
10. Dasgupta I., Malathi V.G., Mukherjee S.K. (2003). Genetic engineering for virus resistance. Crop Sci. 84:341–354.

11. Fuchs M., Cambra M., Capote N. (2007). Safety assessment of transgenic plums and grapevines expression viral coat protein genes: new insights into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance. Journal of plant pathology. 89 (1), 5-12.
12. Fuchs M., Gonsalves D. (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. Ann. Rev. Phytopathol. 45, 173-202.
13. Gonsalves D., Chee P., Provvidenti R., Seem R., Slightom J.L. (1992). 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. 10:1562–70.
14. Hsieh Y.T., Pan T.M. (2006). Influence of planting *papaya ringspot virus* resistant transgenic papaya on soil microbial biodiversity. J. Agric. Food Chem. 54:130–37
15. Jacquet C., Ravelonandro M., Bachelier J., Dunez J. (1998). High resistance to *plum pox virus* (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated forms of PPV coat protein gene. Transgenic Res. 7:29–39.
16. Kollar A., Dalmay T., and Burgyan J. (1993). Defective interfering RNA mediated resistance against *cymbidium ringspot tombusvirus* in transgenic plants. Virology. 193: 313-318.
17. Lazarowitz S.G., Beachy R.N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. Plant Cell. 11:535–48.
18. Lecoq H., Pitrat M. (1985). Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three *potyviruses* infecting muskmelon. Phytopathology. 75:890–93.
19. Lecoq H., Ravelonandro M.,Wipf-Scheibel C., Monsion M., Raccah B., Dunez J. (1993). Aphid transmission of a nonaphid-transmissible strain of *Zucchini yellow mosaic potyvirus* from transgenic plants expressing the capsid protein of *Plum pox potyvirus*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6:403–6.
20. Lindbo J.A., Dougherty W.G. (2005). Plant pathology and RNAi: a brief history. Annu. Rev. Phytopathol. 43:191–20.
21. Lomonossoff G.P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 323-343.
22. Maiss E., Koenig R., Lesemann D.E. (1994). Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. In: Proceedings of the 3rd International Symposium on "The biosafety results of field tests of genetically modified plants and micro-organisms. Monterey, California, pp. 129-139.
23. Nejidat A., Beachy R.N. (1990). Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of *tobacco mosaic virus* are resistant to some other *tobamoviruses*. Mol. Plant Microbe Int. 3: 247-251.
24. Palukaitis P., Zaitlin M. (1997). Replicase-mediated resistance to plant virus disease. Adv. Virus. Res. 48:349-77

25. Powell-Abel P., Nelson R.S., De B., Hoffmann N., Rogers S.G. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. Science 232:738–43.
26. Prins M. (2003). Broad virus resistance in transgenic plants. Trends Biotechnol. 21:373–375.
27. Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. Mol. Plant Pathol. 9(1). 73-83.
28. Pruss G., Ge X., Shi X.M., Carrington J.C., Bowman Vance V. (1997). Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. Plant Cell. 9:859–68.
29. Raybould A.F., Cooper J.I. (2005). Tiered tests to assess the environmental risk of fitness changes in hybrids between transgenic crops and wild relatives: the example of virus resistant *Brassica napus*. Environ. Biosafety Res. 4, 125–140.
30. Richards A., Scown J. (2002). Environmental risks associated with viral recombination in virus resistant transgenic plants. A Consultancy Report by CSIRO for Environment Australia. 40-50.
31. Robaglia C., Durand-Tardiff M., Tonchet M., Boudazin G., Astier-Manifacier S., Casse-Delbart F. (1989). Nucleotide sequence of *potato virus Y* (N strain) genomic RNA. J Gen Virol. 70:935–94.
32. Robaglia C., Tepfer M. (1996). Using nonviral genes to engineer virus resistance in plants. Biotechnol. Annu. Rev. 2:185–204.
33. Rochow W. (1970). Barley yellow dwarf virus: phenotypic mixing and vector specificity. Science. 167:875–78.
34. Sanford J.C., Johnston S.A. (1985). The concept of pathogen derived resistance: deriving resistance from the parasite's own genome. J. Theor. Biol. 113: 395-405.
35. Schubert J., Matousek J., Mattern D. (2004). Pathogene-derived resistance in potato to potato virus Y- aspects of stability and biosafety under field condition. Virus research. 100, 41-50.
36. Sherwood J.L., Fulton R.W. (1982). The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. Virology. 119:10-158.
37. Silva-Rosales L., Lindbo J.A., Dougherty W.G. (1994). Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a *potyvirus* coat protein nucleotide sequence. Plant Mol. Biol. 24:929–39.
38. Simon A.E., Bujarski J.J. (1994). RNA-RNA recombination and evolution in virus-infected plants. Annual Review of Phytopathology. 32:337-362.
39. Stanley J., Frischmuth T., Ellwood S. (1990). Defective viral DNA ameliorates symptoms of *geminivirus* infection in transgenic plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 6291-6295.

40. Stark D.M., Beachy R.N. (1989). Protection against *potyvirus* infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. Biotechnology 7:1257-62.
41. Tepfer M. (2002). Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. Annu. Rev. Phytopathol. 40:467–91.
42. Vance V.B., Berger P.H., Carrington J.C., Hunt A.G., Shi X.M. (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic plants. Virology. 206:583-590.
43. Vaucheret H., Fagard M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. Trends Genet 17:29–35.
44. Voinnet O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends Genet. 17:449–459.
45. Wassenegger M., Pe´lissier T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. Plant Mol Biol. 37:349–362.
46. Waterhouse P.M., Graham M.W., Wang M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA. 95:13959–13964.
47. Yeh S.D., Gonsalves D. (1994). Practices and perspectives of control of *papaya ringspot virus* by cross protection. In Advances in Disease Vector Research, ed. KF Harris. pp. 237–57.
48. Ziegler-Graff V., Guilford P.J., Baulcombe D.C. (1991). *Tobacco rattle virus* RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. Virology. 182: 145-55.