مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

کاربرد همسانه‌های عفونت‌زا در ویروس‌شناسی گیاهی

20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0

فرشته اسماعیل‌زاده[۱]، داود کولیوند[۲*]

۱- دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

koolivand@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۱

صفحه ۳۸-۱۹

چکیده

ویروس‌های گیاهی نه تنها به دلیل تهدیدی که برای تولید محصولات دارند، بلکه به دلیل کابرد آن‌ها به‌عنوان ابزارهای تحقیقی در بیماری‌شناسی گیاهی در سطح مولکولی و سایر زمینه‌های بیوتکنولوژی مهم هستند. بیشتر تحقیقات و دستاوردها در زمینه بیماری‌شناسی گیاهی به توانایی حفظ، تکثیر و اصلاح ژنوم‌های ویروسی گیاه به‌صورت همسانه عفونت‌زا (infectious clone) بستگی دارد. همسانه عفونت‌زا یک همسانه کامل دی.ان.ای (full-length DNA clone) است که با استفاده از آن می‌توان رونوشت‌های آلوده‌کننده را در شرایط آزمایشگاهی یا طبیعی با یک پیشبر مناسب تولید کرد. از همسانه‌های عفونت‌زا می‌توان برای مطالعه چرخه زندگی ویروس‌ها، تکثیر و بیان ژن‌های ویروسی، درک تقابل ویروس-میزبان، مطالعه ژنومیکس عملکردی و غربالگری ژرم‌پلاسم به‌عنوان بخشی از برنامه‌های پیش از تکثیر برای مقاومت در برابر ویروس استفاده کرد. با اینحال، همسانه عفونت‌زای ویروس گیاهی به دلیل توانایی در بازگشت به ویروس تیپ وحشی در اثر نوترکیبی، ممکن است خطراتی برای محیط زیست ایجاد کنند. این مقاله علمی مروری با معرفی همسانه عفونت‌زای ویروس‌ها به بررسی مزایا و معایب کار با ویروس‌های گیاهی که از نظر ژنتیکی اصلاح شده‌اند، می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی: بررسی بیماری‌زایی ویروس، ژنومیکس عملکردی، ویروس‌های مهندسی شده، همسانه‌سازی.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

مقدمه

همسانه‌های (clones) عفونت‌زا برای ویروس‌های گیاهی به همسانه‌های دی.ان.اِ گفته می‌شوند که با استفاده از تکنیک‌های زیست مولکولی به‌طور مصنوعی ساخته شده‌اند و فعالیت عفونت‌زایی یکسانی همانند ویروس‌های گیاهی تحت شرایط طبیعی دارند (Wang et al. 2021). ماهیت این همسانه‌های عفونت‌زا این است که آن‌ها یک بانک ژن دی.ان.اِ را نشان می‌دهند که حاوی اطلاعات کامل ژنوم ویروس است (Boyer and Haenni, 1994).

به‌طور معمول، همسانه کامل cDNA (full-length cDNA clone: FL-cDNA) برای ویروس‌های گیاهی با استفاده از فناوری ژنتیک معکوس ساخته و در ادامه، برای شناسایی ویروس‌های آر.ان.ای‌دار در سطح دی.ان.اِ استفاده می‌شود، بنابراین بر مشکلات موجود در سطح آر.ان.ای غلبه می‌کند. با توجه به ماهیت چنین همسانه‌هایی، همسانه‌های عفونت‌زا به ابزاری ضروری در تحقیقات ویروس گیاهی تبدیل شده‌اند (Kobayashi et al. 2007). ساخت همسانه‌های عفونت‌زای حاوی ژنوم‌های ویروسی نوع وحشی، منبع آماده‌ای از زادمایه (مایه تلقیح) برای غربالگری مقاومت به بیماری از ژنوتیپ‌های مختلف میزبان را در بیماری‌شناسی گیاهی فراهم می‌کند (Brewe et al. 2018). به‌طور معمول، ساخت همسانه‌های FL-cDNA عفونت‌زا، پیچیده و زمان‌بر است و با توجه به نوع ویروس ممکن است متفاوت باشد (Boyer and Haenni. 1994). همسانه‌های FL-cDNA یک ویروس آر.ان.ای‌دار، یک پلاسمید حاوی cDNA ژنومی (full length genomic cDNA) ویروس تحت کنترل پیشبرهای مناسب است که با استفاده از آن می‌توان رونوشت دی.ان.ای مکمل (cDNA) ژنومی ویروسی به آر.ان.ای ژنومی ویروسی را در شرایط طبیعی (*in vivo*) یا آزمایشگاهی (*in vitro*) برای ایجاد آلودگی روی گیاهان میزبان رونویسی کرد (Li et al. 2019). همسانه‌های FL-cDNA اطلاعات ارزشمندی از بیان ژنوم، تکثیر و چرخه آلودگی ویروسی را فراهم می‌کنند (Bhat and Rao. 2020). اولین ویروس گیاهی آر.ان.ای‌داری که چنین همسانه‌هایی برای آن تولید شد، brome mosaic virus بود. پس از این، همسانه کامل cDNA از ویروس موزاییک توتون (tobbaco mosaic virus) و ویروس موزائیک گوجه فرنگی (tomato mosaic virus) و سایر ویروس‌های گیاهی تولید شد که می‌توان از آن‌ها رونوشت‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

آر.ان.ای آلوده‌کننده را در شرایط آزمایشگاهی تولید کرد (Dawson et al. 1986).

کاربرد و اهمیت همسانه‌های عفونت‌زا

همان‌طوری‌که اشاره شد، ویروس‌های گیاهی اصلاح‌شده از نظر ژنتیکی یا همسانه‌های عفونت‌زای ویروس گیاهی کاربردهای گسترده‌ای در بیماری‌شناسی گیاهی و شناخت مسیرهایی بیماری‌زایی ویروس‌ها دارند. این فناوری امکان مطالعه ویروس‌های موجود در غلظت بسیار محدود در گیاهان میزبان یا ویروس‌هایی که جداسازی آن‌ها مشکل است را فراهم می‌کند (Nagyova and Subr, 2007). همسانه‌های عفونت‌زا برای مطالعه چرخه زندگی ویروس‌ها، عملکرد پروتئین‌های آن‌ها و برهم‌کنش با فاکتورهای مختلف میزبان، از جمله مکانیسم‌های عملکرد ژن‌های مقاومت در برابر ویروس‌های مربوطه کاربرد گسترده‌ای دارند. همسانه‌های عفونت‌زا، به‌عنوان مجموعه‌ی ژن‌های ویروسی برای طراحی استراتژی‌های ضد ویروسی در نظر گرفته می‌شوند و منبع اساسی مواد برای تهیه ناقلین ویروسی هستند (Boyer and Haenni, 1994). واضح است که یک ساختار کامل عفونت‌زا از ویروس با فراهم آوردن ابزاری برای تجزیه و تحلیل ژنتیک معکوس، درک ما را از همه جنبه‌های زیست‌شناسی آن ویروس افزایش می‌دهد (Ahlquist et al. 1984).

همسانه عفونت‌زا نیاز به نگهداری و مایه‌زنی‌های متعدد (پاساژ) ویروس در داخل گیاهان را برطرف می‌کند و یک جایگزین برای روش‌های مایه‌زنی دشوار یا ناکارآمد مانند پیوند یا آلودگی توسط ناقلین حشره‌ای را فراهم می‌کند (Brewer et al. 2018). همسانه‌های عفونت‌زا همچنین از نظر ژنتیکی منبع یکنواختی از ماده مایه‌زنی را فراهم می‌کنند و موانع ایجادشده توسط جمعیت‌های ویروسی متغیر از نظر ژنتیکی یا جهش‌هایی را که در هنگام انتقال به گیاه اتفاق می‌افتد را از بین می‌برند (Brewer et al. 2018). همسانه‌های عفونت‌زا نقش بسیار اساسی در تحقیقات ویروس‌های آر.ان.ای‌دار دارند زیرا حفظ و دستکاری ژنوم‌های آر.ان.ای‌دار دشوار است. فعالیت‌های تحقیقاتی مربوط به بیماری‌زایی ویروسی، عملکرد ژن‌های ویروسی، آلودگی ویروسی و تکثیر یا تولید واکسن به‌طور معمول شامل دستکاری های ژنتیکی ژنوم است که انجام آن بدون همسانه cDNA کامل عفونت‌زا از ژنوم ویروسی تقریباً غیرممکن است. همسانه عفونت‌زای دی.ان.ای ویروسی، یک شمشیر دو لبه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

است که امکان دستکاری ژنوم ویروسی به اختیار خود، امکان آنالیز ژنتیکی بی‌سابقه و استفاده از ویروس‌ها به‌عنوان وکتورهایی برای ژن درمانی را فراهم می‌کند. استفاده از همسانه‌های عفونت‌زا برای بیان موقت ژن مورد نظر در گیاهان اغلب نسبت به تراریخته پایدار، محبوب‌تر است. به دلیل سهولت و سرعت تغییر ژنوم ویروسی در مقایسه با گیاهان، سطح بالایی از پروتئین به دست آمده و همچنین به دلیل پتانسیل استفاده در طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها، چنین سیستم‌هایی نویدبخش تولید واکسن‌ها، آنتی‌ژن‌ها، هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌های درمانی، بیوپلیمرهای صنعتی و نانوذرات هستند (Brewer et al. 2018).

انواع روش‌های ساخت همسانه عفونت‌زا

همسانه‌های عفونت‌زا قبلاً با روش دشوار تکه‌تکه کردن قطعات cDNA تحت کنترل یک پیشبر منتخب، تولید می‌شدند. با بهبود آنزیم رونویسی معکوس با خصوصیت تصحیحی و پلیمرازهای دی.ان.ای مقاوم در برابر حرارت، اکنون تولید همسانه FL-cDNA عفونت‌زا از طریق رونویسی معکوس و تکثیر ژنوم ویروسی کامل با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان‌پذیر شده است (Rabindran et al. 2005). انواع روش‌های ساخت همسانه عفونت‌زا برای ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.ا رشته مثبت، آر.ان.ا رشته منفی، ژنوم چند بخشی و ژنوم دی.ان.اِ در زیر آورده شده است.

۱. ساخت همسانه عفونت‌زا برای ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.ا رشته مثبت

فناوری cDNA آلوده‌کننده برای مطالعه ویروس‌های آر.ان.ای رشته مثبت به سرعت مورد استفاده قرار گرفت. از آنجایی‌که انتهای کامل '۵ برای پیشبری اولین دور ترجمه و تکثیر رونوشت‌ها برای تولید ژنوم‌های ویروسی آلوده‌کننده ضروری است، پلاسمیدها و رونوشت‌های cDNA آلوده‌کننده اغلب با پیشبر T7، SP6، آر.ان.ای پلیمراز I یا آر.ان.ای پلیمراز II باکتریوفاژ دقیقاً در انتهای '۵، cDNA ژنومی ویروس متصل می‌شوند (Qian et al. 2017; Jackson and Li. 2016). انتهای کامل '۳ نیز ضروری است و بنابراین پایانبرهای رونویسی یا ریبوزیم‌های ویروس هپاتیت دلتا اغلب در انتهای '۳ قرار دارند و رونوشت‌هایی با انتهای '۳ کامل تولید می‌کنند (Jackson and Li. 2016; Bordat et al. 2012).

از آنجایی‌که ویروس‌های گیاهی آر.ان.ای‌دار به‌طور معمول به‌صورت جمعیت‌های شبه‌گونه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

(quasispecies) با جهش‌های متعدد پیرامون یک توالی واریانت غالب اتفاق می‌افتند، ممکن است لازم باشد که چندین همسانه کامل به‌منظور آلودگی زیاد تولید شود. سایر همسانه‌ها ممکن است از نظر حرکتی نقص داشته باشند، به شدت عفونت‌زا نباشند و یا با سطوح بالای آلودگی تجمع پیدا نکنند (Abrahamian et al. 2020).

۲. ساخت همسانه عفونت‌زا برای ویروس‌هایی با ژنوم چند بخشی

برای ویروس‌هایی با ژنوم چند بخشی، ممکن است با حفظ قسمت‌های مختلف ژنوم ویروسی در همسانه‌های cDNA مختلف، درجه‌ای از مهار بیولوژیکی قبل از مایه‌زنی به دست آید. سپس گیاه میزبان باید با همسانه‌های مختلف به‌طور همزمان مایه‌زنی شود تا ذرات ویروس آلوده‌کننده کامل ایجاد شود، همانطوری‌که برای ویروس موزاییک نواری جو با ژنوم سه بخشی انجام شده است (Lee et al. 2012).

۳. ساخت همسانه عفونت‌زا برای ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.ای رشته منفی

برای ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.ای رشته منفی، همسانه عفونت‌زا از چندین *Bunyavirus* آلوده‌کننده پستانداران گزارش شده است (Hoenen and Feldmann, 2017) اما پیشرفت محدودی در توسعه چنین فناوری برای ویروس‌های آلوده‌کننده گیاه وجود دارد (Jackson and Li, 2016). محدودیت اصلی این است که آر.ان.ای بدون پروتئین نوکلئوکپسید ویروسی، قابل انتقال و آلوده‌کننده نیست (Mielke-Ehret and Muhlbach, 2012). توسعه این فناوری برای ویروس‌هایی با ژنوم آر.ان.ای رشته منفی، کُند بوده است. به‌خصوص برای ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم‌های آر.ان.ای رشته منفی چند بخشی بسیار دشوار است و بسیاری از آن‌ها برای موفقیت در انتقال نیاز به ناقل حشره‌ای دارند (Pang et al. 2019).

۴. ساخت همسانه عفونت‌زا برای ویروس‌هایی با ژنوم دی.ان.ای

ویروس‌های دی.ان.ای‌دار به‌منظور تسهیل برش و تکثیر اولیه ژنوم به‌طور معمول به‌صورت دیمرهای ناقص همسانه می‌شوند. در این روش برای تغییر ساختمان اصلی پلاسمید، نیازهای کمتری برای شبیه‌سازی ژنوم ویروسی و ایجاد جایگاه‌های برش آنزیمی برای درج ژن مورد نظر وجود دارد (Abrahamian et al. 2020).

برای انتقال بسیاری از *بگوموویروس*‌ها، ساختن دیمرهای ناقص (که بیتمر نیز نامیده می‌شوند) از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

اجـزای دی.ان.ای ویروسـی کـه حـداقل دو منشـا تکثیر دارند، ضروری است. از این سازه‌ها، اجزای ژنوم واحد با تکثیر یا نوترکیبی آزاد می‌شود. ایـن سازه‌ها را می‌تـوان بـه پلاسـمید منتقـل کـرد و از طریق مایه‌زنی با اگروباکتریوم بـرای آلـودگی، بـه گیاهان انتقال داد (Bhat and Rao, 2020).

روش‌های ساخت همسانه عفونت‌زا بر اساس محـل رونویسی

تولید یک همسانه cDNA عفونت‌زا بـرای درک بهتر روند آلودگی ویروسی در دو سطح سـلولی و مولکولی بسیار مهم است. در حال حاضر دو روش برای ساخت همسانه‌های عفونت‌زا بر اساس محل رونویسی وجود دارد.

۱. ساخت FL-cDNA تحت کنترل پیشبر باکتریوفاژ (رونویسی در شرایط آزمایشگاهی)

بـــرای اســـتراتژی رونویســـی در شـــرایط آزمایشگاهی، cDNA ویروسی تحـت یـک پیشـبر آر.ان.ای پلیمراز باکتریوفـاژ (بیشـتر T7، SP6 یـا T3) قـرار مـی‌گیـرد و سـپس قبـل از مایـه‌زنی مکـانیکی بـه یـک واکـنش رونویسـی در شـرایط آزمایشگاهی نیاز اسـت (Carvalho et al. 2016). وقتی صحبت از ساخت همسانه کامل عفونت‌زا از یک ژنـوم ویروسـی مـی‌شـود کـه رونوشـت‌های عفونت‌زا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواننـد تولیـد شوند، چندین محدودیت وجـود دارد. یـک نکتـه مهـــم در تهیـــه و کـــاربرد آر.ان.ای عفونـــت‌زا، رونویسی در شرایط آزمایشگاهی (استانداردسازی آن با توجه به کیفیت و کمیـت عملکـرد) اسـت و دستکاری‌های بیشتر بـا آر.ان.ای جداشـده کـه بـه تجزیه آنزیم بسیار حساس است (Nagyova and Subr, 2007). از طرف دیگر لازم نیسـت سـازه‌ها به هسـته وارد شـوند، رونوشـت‌ها بـه‌عنوان یـک آر.ان.ای پیـــک (mRNA) آمـــاده ترجمـــه در سیتوپلاسم، عمل می‌کننـد. در ایـن نـوع آلـودگی، رونویسی در شرایط آزمایشگاه توسط یـک پیشـبر قوی باکتریوفاژ انجام می‌شود. پیشبرهای فاژهـا از جمله SP6، T3 و بـه‌طور عمـده T7 اسـتفاده مـی شـوند زیـرا آن‌هـا عملکـرد بـالایی بـرای تولیـد رونوشـت‌ها دارنـد (Dunn and Studier, 1983). چندین راهکار برای اتصـال پیشـبر رونویسـی بـه شروع توالی ویروسی استفاده شده است. بـه‌عنوان مثال وکتورهای رونویسی عمومی دقیقاً در محـل شـروع رونویسـی بـا یـک محـل همسانه‌سـازی مبتنی‌بر آنزیم‌های برشی ساخته شده‌اند (Jobling et al. 1988; Ahlquist et al. 1984). تا به امروز، FL-cDNA در بسیاری از ویروس‌ها تحت کنتـرل پیشبر باکتریوفاژ بدست آمده است. به‌عنوان مثال،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

potato virus x ،turnip crinkle virus (Hemenway et al. 1990)، papaya ringspot virus (Chiang and Yeh, 1997)، tobacco mosaic virus (Chapman. 2008)، soybean yellow mottle mosaic virus (Nam et al. 2009) و pepper mottle virus (Lee et al. 2011).

۲. ساخت FL-cDNA تحت کنترل پیشبر 35S ویروس موزائیک گل کلم (CaMV) (رونویسی در شرایط طبیعی)

روش دوم در ساخت همسانه‌های عفونت‌زا، تکثیر آر.ان.ای‌های ویروسی عفونت‌زا با رونویسی در شرایط طبیعی cDNA در وکتورهای دوتایی (binary vector) از طریق یک پیشبر CaMV 35S است. در این روش، سازه‌ها با FL-cDNA قرار گرفته در پایین‌دست پیشبر CaMV 35S برای شروع رونویسی در انتهای ´۵، آر.ان.ای ویروسی در هسته سلول تهیه می‌شوند (Dessens and Lomonossoff, 1993). در انتهای ´۳، سیگنال نوپالین سنتاز پلی A (nos-poly (A): NOS A) و اوکتوپین سنتاز (OCS) برای خاتمه‌دادن به رونویسی در شرایط طبیعی از طریق پلی‌آدنیلاسیون استفاده می‌شود (Scholthof et al. 1992). همزمان با رونویسی گیاه، پیشبر 35S شناخته می‌شود و رونوشت‌های تولیدشده در این نسخه‌برداری، آر.ان.ای‌های ژنومی ویروسی را تولید می‌کنند و تکثیر ویروسی آغاز می‌شود. افزودن پایانبر NOS می‌تواند به‌طور موثری از سنتز رونوشت‌های طولانی‌تر از اندازه ژنومی جلوگیری کند (Dessens and Lomonossoff. 1993).

چندین ویروس آر.ان.ای‌دار گیاهی مانند carnation mottle virus (Zhang et al. 2002)، plum pox virus (Maiss et al. 1992)، potato virus Y (Fakhfakh et al. 1996)، citrus tristeza virus (Gowda et al. 2005)، grapevine leaf roll-associated virus 2 (Kurth et al. 2012)، sesbania mosaic virus (Govind et al. 2012) و potato leaf roll virus (Lee et al. 2011) برای تولید cDNA پلاسمید عفونت‌زا با پیشبر CaMV 35S در ترکیب با سیگنال پلی A در انتهای ´۳ مورد استفاده قرار گرفته‌اند. انتقال همسانه cDNA برای رونویسی در شرایط طبیعی را می‌توان با مایه‌زنی توسط آگروباکتریوم، بمباران ذرات یا سایش بر روی برگ‌ها انجام داد. تکثیر آر.ان.ای ویروسی عفونت‌زا با رونویسی وکتورهای حاوی cDNA در شرایط طبیعی مزایای متعددی دارد: اولاً، فرآیند

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

تکثیر می‌تواند بر اثرات مخرب ناشی از تخریب آر.ان.ای غلبه کند، زیرا توانایی آلودگی همسانه عفونت‌زا که فقط در سلول‌هایی که آر.ان.ای ساخته می‌شود، کمتر تخریب خواهند شد. ثانیاً، مرحله رونویسی در شرایط آزمایشگاهی مورد نیاز نیست. این امر به‌ویژه برای ویروس‌های آر.ان.ای‌داری که تولید یک عملکرد خوب از رونوشت‌های طول کامل با عفونت‌زایی بالا می تواند دشوار باشد، بسیار مهم است. ساخت FL-cDNA با این روش هزینه کمتری دارد، زیرا به معرف‌های پرهزینه مانند آنالوگ‌های کلاهک (cap) و آر.ان.ای پلیمرازها نیازی نیست (Boyer and Haenni, 1994).

علاوه‌براین، روند تکثیر ویروس و بیان ژن‌های ویروسی تا حد زیادی مستقل از یکدیگر هستند که ممکن است هنگام مطالعه نقش و مکان‌یابی پروتئین‌های بیان‌شده توسط آر.ان.ای‌های ویروسی جهش‌یافته که قادر به تکثیر در سلول‌ها نیستند، بسیار راحت باشد. رونوشت‌های ویروسی تولیدشده به این روش در شرایط طبیعی مانند آر.ان.ای‌های پیام‌رسان تولیدشده توسط آر.ان.ای پلیمراز میزبان رفتار می‌کنند و هنوز هم قادر به تولید پروتئین‌های بومی (native) یا جهش‌یافته بدون تکثیر هستند (Van Bokoven et al. 1993).

همسانه‌های دی.ان.ای به شکل دی.ان.ای پلاسمید جدا شده، برای مدت طولانی در شرایط آزمایشگاه پایدار هستند. از طرف دیگر، سازه وارد هسته می‌شود تا امکان رونویسی فراهم شود و این امر باعث کاهش کارایی در روش‌های انتقال این همسانه‌های عفونت‌زا می‌شود. ممکن است با انتقال رونوشت‌های پیچیده ویروسی در سیتوپلاسم مشکلاتی از قبیل ویرایش توسط میزبان به وجود آید که سبب کاهش کارایی همسانه‌های عفونت‌زا می‌شود. یکی دیگر از مزایای رونوشت‌ها در شرایط طبیعی، زمانی است که تکثیر ویروس‌ها نمی‌توانند به‌صورت مکانیکی منتقل شوند (Grimsley et al. 1987)، امکان آلوده کردن گیاهان با مایه‌زنی مکانیکی، بمباران ذرات (Gal-On et al. 1995) و آلودگی توسط آگروباکتریوم وجود دارد.

کارایی همسانه‌های عفونت‌زای ساخته‌شده

پس از تهیه موفق همسانه کامل cDNA، عوامل مختلفی وجود دارند که بر کارایی آن تاثیر دارند. کارایی ممکن است به‌عنوان درصد پرتوپلاست‌های آلوده، درصد گیاهان میزبان که به‌طور سیستمیک علائم نشان می‌دهند، تعداد زخم‌های موضعی در گیاهان میزبان با حساسیت زیاد و با آنالیز آر.ان.ای ویروسی یا پروتئین مورد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

ارزیابی قرار گیرد (Conmmandeur et al. 1991). کارایی رونوشت‌ها متغیر است. در برخی موارد در مقایسه با کارایی آر.ان.ای ویریونی والدین به ۱۰۰٪ یا بیشتر می‌رسد (Hayes and Buck, 1990).

عوامل زیر بر شدت کارایی همسانه‌های عفونت‌زا اثر می‌گذارند:

۱. ناهمگنی مربوط به طول جمعیت رونوشت‌ها به‌ویژه در آر.ان.ای عفونت‌زا (Hamilton and Baulcombe, 1989)

۲. وجود جهش‌های نقطه‌ای ناشی از عدم دقت آنزیم‌های سنتز آر.ان.ای و دی.ان.ای به‌ویژه در ژنوم‌های ویروسی طویل. با در نظر گرفتن ثبات نسبتاً کم آر.ان.اِ پلیمراز وابسته به آر.ان.اِ (RNA dependent RNA Polymerase) ویروسی، جهش‌ها را هرگز نمی‌توان به‌طور کامل از بین برد (Ramirez et al. 1995)

۳. توالی‌های نزدیک به انتهای ´۵ و ´۳ سازه به‌عنوان توالی نوکلئوتیدهای غیر ویروسی و وجود ساختار کلاهک در انتهای ´۵ یا دم پلی A در انتهای ´۳.

با اینحال، پارامترهای مختلفی وجود دارد که روی کارایی یک همسانه عفونت‌زا یعنی ناهمگنی جمعیت رونوشت، وجود جهش‌های نقطه‌ای، حضور نوکلئوتیدهای غیر ویروسی، اثر ساختار کلاهک، بی‌ثباتی در باکتری و آر.ان.ای پلیمرازها تأثیر چشمگیری دارد. بنابراین نمی‌توان یک پروتکل عمومی بهینه را که برای همه ویروس‌ها مفید باشد، تنظیم کرد. با این وجود، باید به خاطر داشت که برای تولید موفق یک همسانه عفونت‌زا، ورود هر توالی غیر ویروسی بین پیشبر و پایانبر باید به حداقل برسد (Boyer and Haenni, 1994). به‌طور کلی، تأثیر توالی‌های نزدیک به انتهای ´۵ ژنوم ویروسی به‌طور قابل توجهی بیشتر از انتهای ´۳ است. گاهی اوقات، به دلیل وجود یک یا دو نوکلئوتید (به‌طور معمول G) در انتهای ´۵ سازه، قابلیت آلودگی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته یا از بین می‌رود. این بیان ممکن است توسط مکانیسم‌های مختلف مهار شود، اما جزئیات مشخص نیست (Eggen et al., 1989). ساختار کلاهک روی انتهای ´۵ رونوشت‌های یوکاریوتی برای پایداری و شروع بهینه ترجمه آن‌ها ضروری است. دی.ان.ای پلیمرازها با ثبات بالا برای PCR ضروری هستند (Contreras et al. 1982). همسانه کامل ممکن است توسط یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طولانی (long PCR) که به آنزیم خاص نیاز دارد یا از طریق اتصال چندین محصول PCR با استفاده از جایگاه‌های محدود و منحصر به فرد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

طبیعی به دست آید.

انواع روش‌های استفاده‌شده برای انتقال سازه‌های ساخته‌شده به گیاهان

از آنجایی‌که بیان محصول نهایی باید در گیاهان انجام شود، همسانهٔ تهیه‌شده از اسید نوکلئیک ویروسی لازم است به سلول‌های میزبان خود وارد شود. انتقال cDNA به هسته سلول، جایی‌که رونویسی در آن انجام می‌شود، برای بیان موفقیت‌آمیز ضروری است (Nagyova and subr, 2007). بسیاری از فناوری‌ها برای انتقال ژن مورد نظر به داخل سلول‌های گیاهی در دسترس هستند و به‌طور عمده در دو گروه طبقه بندی می‌شوند: انتقال ژن مستقیم و غیر مستقیم (Bhat and Rao, 2020). روش انتقال مستقیم ژن شامل استفاده از تجهیزات فیزیکی برای انتقال محصول ژنی، یعنی، مایه‌زنی مکانیکی، بمباران biolistic/ذرات، تبدیل پروتوپلاست و الکتروپوریشن است. در روش انتقال ژن غیر مستقیم از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* به‌عنوان وسیله‌ای برای انتقال دی.ان.ای استفاده می‌شود که بخشی از دی.ان.ای خود را (T-DNA) به ژنوم گیاه میزبان منتقل می کند. کارآمدترین این روش‌ها، agroinfection، microinjection و biolistic هستند (Dagless et al. 1997). مایه‌زنی مکانیکی تاثیر کمتری دارد، اما بسیار ساده، سریع و ارزان است. در ادامه به توضیح این روش‌ها خواهیم پرداخت.

۱. مایه‌زنی با آگروباکتریوم (agroinoculation/agroinfection)

این روش یک روش بسیار کارآمد برای وارد کردن ژن مورد نظر به گیاهان است، به دلیل ثبات بالای رونوشت‌های سنتزشده در شرایط طبیعی، از وکتورهای دوتایی مبتنی‌بر آگروباکتریوم به‌طور گسترده‌ای برای انتقال کپی‌هایی از طول کامل ژنوم عفونت‌زای ویروسی درج‌شده در منطقه T-DNA پلاسمیدها، به گیاهان استفاده شده است. هنگامی‌که T-DNA با یک همسانه cDNA از یک ویروس جایگزین می‌شود، ویروس رونویسی شده، از طریق منافذ هسته‌ای از هسته به سیتوپلاسم منتقل و پس از جایگذاری، تکثیر یافته و باعث آلودگی در گیاه میزبان می‌شود. این روش به‌طور معمول با مایه‌زنی برگ‌ها (یا تزریق به ساقه یا دمبرگ) با سلول‌های *A. tumefaciens* انجام می‌شود (Abrahamian et al. 2020).

مایه‌زنی با اگروباکتریوم برای چند ویروس محدود به آوندهای آبکش در خانواده Luteoviridae مانند ویروس زردی غربی چغندر، ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی و ویروس زردی خفیف چغندر موفقیت‌آمیز گزارش شده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

است. این‌ها ویروس‌های آر.ان.ای‌دار با ژنوم‌های خطی هستند که با مایه‌زنی مکانیکی معمولی نمی‌توانند به گیاهان منتقل شوند، اما به طرق دیگر مانند مایه‌زنی با آگروباکتریوم منتقل می‌شوند. از طرف دیگر، آلودگی با آگروباکتریوم با همه گونه‌های گیاهی سازگار نیست و این می‌تواند به‌عنوان یک نقطه ضعف در نظر گرفته شود (Nagyova and Subr. 2007). آر.ان.ای ویروسی رونویسی‌شده در شرایط طبیعی از دی.ان.ای منتقل‌شده توسط آگروباکتریوم، بیان پروتئین‌های رمز شدهٔ ویروسی دخیل در تکثیر و سرکوب خاموشی آر.ان.ای را شروع می‌کند و باعث شروع یک چرخه از تکثیر و گسترش سیستمیک ویروس در سراسر گیاه می‌شود (Leiser et al. 1992; Prufer et al. 1995). گونه ویروس، سازه ویروس، سویه آگروباکتریوم و ژنوتیپ میزبان همگی در میزان موفقیت مایه‌زنی با آگروباکتریوم نقش دارند.

۲. Microinjection

در روش microinjection، ژن‌ها به‌طور مستقیم به پروتوپلاست، رویان یا کشت مریستم منتقل می‌شوند. این دستگاه نسبتاً گران‌قیمت بوده و این روش به شخص ماهر و آموزش‌دیده نیاز دارد (Kost et al. 1995).

۳. Biolistic

در روش biolistic، مولکول‌های اسید نوکلئیک با ذرات طلا یا تنگستن کلوئیدی همراه می‌شوند و سپس به‌طور مستقیم به بافت‌های گیاه از طریق نیروی هلیوم فشرده شلیک می‌شوند (Nagyova and subr. 2007).

۴. مایه‌زنی مکانیکی

مایه‌زنی مکانیکی به‌طور معمول برای مایه‌زنی رونوشت‌های آر.ان.ای در شرایط آزمایشگاهی و دی.ان.ای سالم پلاسمید حاوی همسانه FL-cDNA انجام می‌شود. در این روش، سطح برگ با سایینده‌ای مانند سلیت یا کاربراندوم آسیب می بیند که اجازه می‌دهد اسید نوکلئیک به‌طور مستقیم وارد سلول‌های آسیب‌دیده شود (Ding et al. 2006).

کارایی یا ناکارآمد بودن سیستم‌های پروکاریوتی برای تهیه همسانه عفونت‌زا

به‌طور معمول برای تهیه همسانه‌های عفونت‌زا از سیستم‌های پروکاریوتی استفاده می‌شود. ژنوم‌های ویروسی برای دستکاری ساده و استفاده از یک روش آزمایشگاهی استاندارد و همچنین برای تکثیر سازه‌های به دست آمده در مقیاس مقدماتی در پلاسمیدهای باکتریایی همسانه می‌شوند. برخی مشکلات ممکن است در اثر عدم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

ثبات cDNA در *Escherichia coli* همسانه‌شده ایجاد شود که منجر به جهش‌های نقطه‌ای یا حذفی می‌شود، که علت آن سمیت توالی‌های ویروسی خاص برای باکتری‌ها است. گاهی اوقات ممکن است با جایگزینی سویه *E. coli* یا وکتور کلونینگ این مشکل برطرف شود (Boyer and Haenni. 1994). برای تولید همسانه‌های عفونت‌زا از ویروس‌های گیاهی که در *E. coli* ناپایدار هستند، قرار دادن اینترون در ژنوم ویروسی برای خاتمهٔ بیان پروتئین‌های سمی نامطلوب در *E. coli*، تاکنون گسترده‌ترین روش مورد استفاده بوده است (Gao et al. 2012).

با این وجود، تعیین تعداد و مکان‌های درج اینترون مورد نیاز برای پایدار کردن همسانه عفونت‌زا وقت‌گیر و دشوار است. برخی روش‌های همسانه‌سازی مستقل از توالی مانند سیستم نوترکیبی مخمر (Youssef et al. 2011)، Gibson assembly و روش‌های همسانه‌سازی in-fusion نیز برای مونتاژ همسانه عفونت‌زا از ویروس‌های گیاهی به‌صورت طبیعی و آزمایشگاهی ایجاد شده است (Blawid and Nagata. 2015). اما محصولات برای تکثیر به انتقال به *E. coli* نیاز دارند. به بیان دیگر، با این روش فقط مونتاژ ژنوم ویروسی آسان می‌شود و مشکل بی‌ثباتی ژنوم ویروسی را در *E. coli* حل نمی‌کند. بنابراین، برای ویروس‌های گیاهی که نمی‌توانند ثبات خود را در *E. coli* حفظ کنند، تولید همسانه عفونت‌زای پایدار با استفاده از روش‌های مونتاژ هنوز به استفاده از درج‌های اینترون بستگی دارد که هم‌چنان یک مانع مهم در مطالعه این ویروس‌ها است (Desbiez et al. 2012).

روش جدید برای غلبه بر مشکل بی‌ثباتی برخی از سازه‌های ساخته‌شده در سیستم‌های پروکاریوتی

یک روش جدید با استفاده از *Rhizobium radiobacter* برای تولید همسانه‌های عفونت‌زای پایدار از ویروس‌های گیاهی که ژنوم آن‌ها در *E. coli* ناپایدار است، ایجاد شده است. در این روش از *R. radiobacter* هم برای همسانه‌سازی و هم مایه‌زنی همسانه عفونت‌زا استفاده می‌شود و نیاز به همسانه‌سازی در *E. coli* را برطرف می‌کند. در این روش که شامل سه مرحله است، همسانه عفونت‌زای پایدار از دو ویروس papaya ringspot virus و papaya leaf distortion mosaic virus به دست آمد، درحالی‌که تلاش برای استفاده از سیستم همسانه‌سازی کلاسیک *E. coli* به‌طور مکرر با شکست مواجه شد. مراحل این روش شامل، ساخت پلاسمیدهای رمزکننده ژنوم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

ویروسی در شرایط آزمایشگاهی با Gibson assembly یک مرحله‌ای؛ انتقال محصولات دی.ان.ای مونتاژشده به *R. radiobacter* و در آخر، مایه‌زنی گیاهان با *R. radiobacter* حاوی ژنوم ویروسی است (Tuo et al. 2017). دو احتمال برای پایداری همسانه عفونت‌زا در *R. radiobacter* حدس زده می‌شود.

۱. تعداد کپی کم از همسانه عفونت‌زا در *R. radiobacter* باعث سمیت کمتری می‌شود.

۲. باکتری *R. radiobacter* نسبت به *E.coli* تحمل بیشتری به سمیت دارد.

در حقیقت، استفاده از وکتورهایی با تعداد کپی کم، روشی برای به دست آوردن همسانه عفونت‌زای پایدار در *E. coli* برای برخی ویروس‌ها است (Almazan et al. 2000).

با اینحال، این همیشه مشکل را حل نمی‌کند. بسیاری از ژنوم‌های ویروسی در *E. coli* حتی با استفاده از وکتورهایی با تعداد کپی کم، ناپایدار هستند. بنابراین، از روش‌های پیچیده‌تری مانند همسانه‌سازی در شرایط آزمایشگاهی و درج اینترون استفاده شده است. استفاده از *R. radiobacter* هم برای همسانه‌سازی و هم مایه‌زنی همسانه عفونت‌زا نشان داد که حتی یک پلاسمید با تعداد کپی بالا حاوی ژنوم ویروسی بدون درج اینترون می‌تواند در *R. radiobacter* پایدار باشد. کارایی بالای انتقال به *R. radiobacter* با پلاسمیدهای مونتاژشده در شرایط آزمایشگاهی ممکن است به دلیل روش‌های مونتاژ دی.ان.ای که جدیدا توسعه یافته‌اند مانند Gibson assembly (Gibson et al. 2009) و in-fusion باشد (Sleight et al. 2010). همسانه عفونت‌زا را می‌توان به آسانی با استفاده از این روش‌های مونتاژ در شرایط آزمایشگاهی ساخت و بازسازی کرد. از مزایای استفاده از *E. coli* در مقایسه با *R. radiobacter* می‌توان به در دسترس بودن *E. coli* در آزمایشگاه‌های مختلف، سریع الرشد بودن *E. coli*، عدم نیاز به محیط کشت اختصاصی و شناخت کامل ژنوم آن اشاره کرد. ولی به دلیل بی‌ثباتی برخی سازه‌ها در *E. coli*، همسانه‌های عفونت‌زای ویروس‌های گیاهی بیشتر و بیشتر با استفاده از روش انتقال به واسطه *R. radiobacter* تولید می‌شوند (Ambros et al. 2011).

ملاحظات ایمنی زیستی برای کار با ویروس‌های مهندسی‌شده

همسانه‌های عفونت‌زای ویروس‌های گیاهی ابزار مهمی با کاربردهای گسترده در زمینه‌های مختلف زیست‌شناسی و پزشکی هستند. استفاده از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

آن‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی شامل مطالعه تقابل ویروس-گیاه و غربالگری ژرم‌پلاسم به‌عنوان بخشی از برنامه‌های پیش از تکثیر برای مقاومت در برابر ویروس است. با اینحال، همسانه عفونت‌زای ویروس گیاهی به دلیل توانایی در بازسازی مجدد ویروس‌های قابل انتقال و دارای عملکرد، ممکن است خطری برای محیط زیست ایجاد کنند. این خطرات هم از بیماری‌زایی ذاتی آن‌ها و هم از تغییرات ژنتیکی ایجاد می‌شود، بنابراین اقدامات موثر مهار لازم است (Brewer et al. 2018).

هیچ بررسی جامعی از ملاحظات ایمنی زیستی برای استفاده از ویروس‌های گیاهی که از نظر ژنتیکی اصلاح شده‌اند، علیرغم اهمیت روزافزون آن‌ها در بسیاری از زمینه‌های بیولوژیکی، انجام نشده است. مهار ویروس‌های نوترکیب را می‌توان با روش فیزیکی با طراحی موانعی که از آزادشدن میکروارگانیسم‌های مهندسی‌شده در محیط جلوگیری می‌کنند (Brewer et al. 2018; Adair et al. 2008) و یا روش بیولوژیکی با تغییر عمدی ژنوم‌های ویروسی، بیماری‌زایی کم یا ناتوانی در انتقال با ناقل انجام داد (Pasin et al. 2019) تا از آسیب رساندن به محیط زیست جلوگیری شود و نگرانی‌های مربوط به خطرات احتمالی برای سلامت انسان را برطرف کند. برای جلوگیری از انتشار ناخواسته ویروس‌های دارای ناقل، جهش‌زایی یا حذف ژن‌های ضروری برای انتقال ویروس انجام شده است. مهار ویروس‌های مهندسی‌شده، خطر نوترکیبی مجدد با ویروس‌های تیپ وحشی که ممکن است منجر به عواقب ناخواسته‌ای مانند گسترش دامنه میزبانی یا افزایش بیماری‌زایی شود را کاهش می‌دهد. نوترکیبی نقش مهمی در تکامل ویروس دارد که می‌تواند منجر به بی‌ثباتی توالی‌های وارد شده در ژنوم‌های ویروسی (Willemsen et al. 2019) و به‌طور بالقوه منجر به ظهور ویروس‌های جدید شود (Tepfer et al. 2015).

درج توالی‌های تکثیری در وکتور ممکن است بی‌ثباتی و بازگشت به تیپ وحشی را طی چند هفته بعد از آلودگی یا هنگام پاساژ ویروس ایجاد کند. سازمان بهداشت جهانی (world health organization: WHO)، راهنمای بین المللی کار با میکروارگانیسم‌های ایجادکننده بیماری و یا اصلاح‌شده از نظر ژنتیکی را که به عهده تک تک کشورها است، ارائه داده است (WHO. 2004).

از ملاحظات کلیدی و مهم برای ارزیابی احتمال خطر ویروس‌های گیاهی می‌توان به اثرات تغییر ژنتیکی، برهمکنش با موجودات دیگر، استقرار در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

محیط، در نظر گرفتن عوامل اقتصادی اجتماعی اشاره کرد. علاوه‌بر خطرات ناشی از انتشار غیرعمدی ویروس‌های گیاهی، در نظر گرفتن پتانسیل انتشار عمدی یا استفاده مخرب از همسانه‌های عفونت‌زای ویروس گیاهی نیز مهم است که به‌عنوان خطر استفاده دوگانه شناخته می‌شود. درحالی‌که جنگ بیولوژیکی به‌طور کلی با عوامل بیماری‌های انسانی مانند سیاه زخم در ارتباط است، اما احتمال استفاده بیوتروریسم از بیمارگرهای گیاهی وجود دارد که می‌تواند تأثیرات مخربی بر امنیت غذایی داشته باشد. هدف قرار دادن محصولات کشاورزی ممکن است از جنگ بیولوژیکی علیه انسان ساده‌تر و از نظر تکنیکی چالش کمتری داشته باشد (Madden and Van Den Bosch, 2002; Whitby. 2001).

مرکز کنترل بیماری ایالات متحده آمریکا (USA centers for disease control: CDC) لیستی از "عوامل انتخابی" را که خطر بیوتروریسم در نظر گرفته می‌شوند و به کنترل نیاز دارند، منتشر کرده است. این لیست شامل برخی از بیمارگرهای گیاهی است اما در حال حاضر هیچ ویروس گیاهی را شامل نمی‌شود. با اینحال، این نگرانی وجود دارد که کشاورزی مولکولی (molecular farming) با استفاده از ویروس‌های گیاهی اصلاح‌شده به دلیل توانایی تولید مقادیر زیادی توکسین انسانی در گیاهان، پتانسیل استفاده دوگانه را دارد (Federation of American Scientists. 2011). بیشتر کارهایی که با ناقلین ویروس‌های گیاهی انجام می‌شود، مربوط به تقابل بین ویروس‌ها و میزبان آن‌ها یا استفاده از ویروس‌های اصلاح‌شده برای به حداقل رساندن پتانسیل گسترش در شرایط طبیعی، به‌منظور تولید پروتئین‌هایی با ارزش درمانی یا تجاری در شرایط بسیار کنترل‌شده برای جلوگیری از انتشار ناخواسته آن‌ها است.

نتیجه‌گیری

پیشرفت‌های عمده‌ای در درک ما از استراتژی‌های بیان ژنوم ویروس‌های گیاهی و برهمکنش ویروس با میزبانش برای تکثیر و حرکت، تحریک بیماری و پاسخ‌های مقاومت از طریق تولید مولکول‌های عفونت‌زا از توالی‌های ویروسی همسانه‌شده حاصل شده است. همسانه‌های عفونت‌زا اطلاعات ارزشمندی را در مورد ژنومیکس عملکردی ویروس ارائه می‌دهند. همسانه‌های عفونت‌زا نقش بسیار اساسی در تحقیقات ویروس‌های آر.ان.ای‌دار دارند زیرا حفظ و دستکاری ژنوم‌های آر.ان.ای دشوار است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

فعالیت‌های تحقیقاتی مربوط به بیماری‌زایی ویروسی، عملکرد ژن‌های ویروسی، آلودگی ویروسی و تکثیر یا تولید واکسن به‌طور معمول شامل دستکاری های ژنتیکی ژنوم است که انجام آن بدون همسانه‌سازی cDNA عفونت‌زا از ژنوم ویروسی تقریباً غیرممکن است. این فناوری ابزاری قدرتمند با کاربردهایی در زمینه‌های مختلف علمی در بیماری‌شناسی گیاهی است. با اینحال، ویروس‌های مهندسی‌شده ممکن است بیماری‌زایی را افزایش دهند. بنابراین، روش‌های مهار آن‌ها باید به دقت طراحی و دنبال شوند.

فهرست منابع

References

Abrahamian P, Hammond RW and Hammond J. 2020. Plant virus–derived vectors: applications in agricultural and medical biotechnology. Annual Review of Virology. 7:13.1–13.23.

Adair D, Irwin R. 2008. A practical guide to containment: plant biosafety in research greenhouses. Blacksburg, VA: Information System for Biotechnology. 2nd Ed.

Ahlquist P, French R, Janda M and Loesch-Fries LS. 1984. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States America. 81: 7066 7070.

Ambros S, El-Mohtar C, Ruiz-Ruiz S, Pena L, Guerri J, Dawson W.O, Moreno P. 2011. Agroinoculation of Citrus tristeza virus causes systemic infection and symptoms in the presumed nonhost Nicotiana benthamiana. Molecular Plant Microbe Interactions. 24: 1119–1131

Almazan F, Gonzalez J.M, Penzes Z, Izeta A, Calvo E, Plana-Duran J, Enjuanes L. 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America. 97: 5516–5521.

Baltimore D. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. Nature. 226: 1209-1211.

Bhat AI, Rao GP. 2020. Characterization of Plant Viruses, Springer Protocols Handbooks, Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_46.

Blawid R, Nagata T. 2015. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly. Journal of Virological Methods. 222: 11–15.

Bordat A, Houvenaghel MC, German-Retana S. 2015. Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. Virology Journal. 12: 89.

Boyer JC, Haenni AL. 1994. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Virology. 198: 415–426.

Brewer HC, Hird DL, Bailey AM, Seal SE and Foster GD. 2018. A guide to the contained use of plant virus infectious clones. Plant Biotechnology Journal. 16: pp. 832–843.

Carvalho SL, Nagata T, Junqueira BR, Zanardo LG, Paiva ACS, Carvalho CM. Construction of a full-length infectious cDNA clone of Cowpea mild mottle virus. Virus Genes. DOI 10.1007/s11262-016-1395-x.

Chapman SN. 2008. Construction of infectious clones for RNA viruses: TMV. Methods in Molecular Biology. 451:477–490.

Chiang CH, Yeh SD. 1997. Infectivity assays of in vitro and in vivo transcripts of papaya ring spot virus. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 38:153–163.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

Commandeur U, Jarausch W, Li Y, Koenig R, Burgermeister W. 1991. cDNAs of beet necrotic yellow vein virus RNA-3 and RNA-4 are rendered biologically active in a plasmid containing the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Virology. 185: 493-495.

Contreras R, Cheroutre H, Degrave W, Fiers W. 1982. Simple, efficient *in vitro* synthesis of capped RNA useful for direst expression of cloned eukaryotic genes. Nucleic Acids Research. 10: 6353-6362.

Dagless EM, Shintaku MH, Nelson RS, Foster1 GD. 1997. A CaMV 35S promoter driven cDNA clone of tobacco mosaic virus can infect host plant tissue despite being uninfectious when manually inoculated onto leaves. Archives of Virology. 142: 183-191.

Dawson WO, Beck DL, Knorr DA and Grantham GL. 1986. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. Proceeding of the National Acadey Sciences of the United States of America. 83: 1832–1836.

Desbiez C, Chandeysson C, Lecoq H, Moury B. 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. Journal of Virological Methods. 183: 94–97.

Dessens JT, Lomonossoff GP. 1993. Cauliflower mosaic virus 35S promoter controlled DNA copies of cowpea mosaic virus RNAs are infectious on plants. Journal of General Virology. 74:889–892.

Ding XS, Schneider WL, Chaluvadi SR, Mian MA, Nelson RS. 2006. Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. Mol Plant Microbe Interacteraction. 19:1229–1239.

Dunn JJ, Studier FW. 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the location of T7 genetic elements. Journal of Molecular Biology. 166: 477-485.

Eggen R, Verver J, Wellink J, De Jong A, Goldbach R, Van Kammen A. 1989. Improvements of the infectivity of *in vitro* transcripts from cloned cowpea mosaic virus cDNA: Impact of terminal nucleotide sequences. Virology. 173: 447-455.

Fakhfakh H, Valaine F, Makni M, Robaglia C. 1996. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. Journal of General Virology. 77: 519–523.

Federation of American Scientists. 2011. Dual-use aspects of plant biotechnology. Available at: https://fas.org/biosecurity/education/dualuseagriculture/2.-agricultural-biotechnology/dual-use-aspects-of-plant-biotec hnology.html.

Gal-On A, Meiri E, Huet H, Hua WJ, Raccah B, Gaba V. 1995. Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of Zucchini yellow mosaic Potyvirus. Journal of General Virology. 76: 3223–3227.

Gao R, Tian YP, Wang J, Yin X, Li XD, Valkonen JP. 2012. Construction of an infectious cDNA clone and gene expression vector of Tobacco vein banding mosaic virus (genus Potyvirus). Virus Research. 169: 276–281.

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods. 6: 343–345.

Grimsley N, Hohn T, Davies JW, Hohn B. 1987. Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. Nature. 325: 177–179.

Govind K, Makinen K, Savithri HS. 2012. Sesbania mosaic virus (SeMV) infectious clone: possible mechanism of 30 and 50 end repair and role of polyprotein processing in viral replication. PLoS One. 7(2): e31190.

Gowda S, Satyanarayana T, Robertson CJ, Garnsey SM, Dawson WO. 2005. Infection of citrus plants with virions generated in Nicotiana benthamiana plants agro-infiltrated with binary vector based Citrus tristeza virus. In: Hilf ME, Duran-Vila N, Rocha-Pena MA (eds) Proceedings of the 16th conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside. pp 23–33.

Hamilton WDO, Baulcombe DC. 1989. Infectious RNA produced by *in vitro* transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA-1 c DNA. Journal of General Virology. 70: 963-968.

Hayes RJ, Buck KW. 1990. Infectious cucumber mosaic virus RNA transcribe in vitro from clones obtained from cDNA amplified using the polymerase chain reaction. Journal of General Virology. 71: 2503-2508.

Hemenway C, Weiss J, O'Connell K, Tumer NE. 1990. Characterization of infectious transcripts from a potato virus X cDNA clone. Virology. 175: 365–371.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

Hoenen T, Feldmann H. 2017. Reverse genetics systems for filoviruses. Methods Molecular Biology. 1602:159-170.

Jackson AO, Li Z. 2016. Developments in plant negative-strand RNA virus reverse genetics. Annual Review of Phytopathology. 54: 469-98.

Jobling SA, Cuthbert CM, Rogers SG, Fraley RT, Gehrke L. 1988. In vitro transcription and translational efficiency of chimeric SP6 messenger RNAs devoid of 5' vector nucleotides. Nucleic Acids Research. 10: 4483-4498.

Kobayashi T, Antar AA, Boehme KW, Danthi P, Eby EA, Guglielmi KM, Holm GH, Johnson EM, Maginnis MS, Naik S, Skelton WB, Wetzel JD, Wilson GJ, Chappell JD, Dermody TS . 2007. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. Cell Host Microbe. 1: 147–157.

Kost B, Galli A, Potrykus I, Neuhaus G. 1995. High-efficiency transient and stable transformation by optimized DNA microinjection into *Nicotiana tabacum* protoplasts. Journal of Experimental Botany. 46: 1157-1167.

Kurth EG, Peremyslov VV, Prokhnevsky AI, Kasschau KD, Miller M, Carrington JC, Dolja VV. 2012. Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. Journal of Virology 86:6002–6009.

Lee MY, Song YS, Ryu KH. 2011. Development of infectious transcripts from full length and GFP-tagged cDNA clones of Pepper mottle virus and stable systemic expression of GFP in tobacco and pepper. Virus Research. 155: 487–494.

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.

Leiser RM, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, Herrbach E, Lemaire O, Guilley H, Richards K, Jonard G . 1992. Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with Beet western yellows luteovirus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89: 9136–9140.

Li ZN, Jelkmann W, Sun PP, Zhang L. 2019. Construction of full-length infectious cDNA clones of apple stem grooving virus using Gibson Assembly method. Virus Research doi: https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197790.

Madden L.V and Van Den Bosch F. 2002. A population-dynamics approach to assess the threat of plant pathogens as biological weapons against annual crops. Bioscience. 52.

Maiss E, Timpe U, Brisske-Rode A, Lesemann DE, Casper R. 1992. Infectious in vivo transcripts of a Plum pox potyvirus full length cDNA clone containing the Cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. Journal of Geneneral Virology. 73: 709–713.

Mielke-Ehret N, Muhlbach HP. 2012. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. Viruses. 4: 1515-36.

Nagyova A, Subr Z. 2007. Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. Acta Virologica. 51: 223–237.

Nam M, Kim SM, Domier LL, Koh S, Moon JK, Choi HS, Kim HG, Moon JS, Lee SH. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of a newly identified member of the genus *Carmovirus*, soybean yellow mottle mosaic virus from soybean. Archives of Virology. 154: 1679–1684.

Panga M, Gayrala M, Lylec K, Shiresd MK, Ongd K, Byrneb D, Verchot J. 2019. Infectious DNA clone technology and inoculation strategy for rose rosette virus that includes all seven segments of the negative-strand RNA genome. Doi: https://doi.org/10.1101/712000.

Pasin F, Menzel W, Daros JA. 2019. Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. Plant Biotechnology Journal. 17: 1010–26.

Prufer DC, Wipf-Scheibel C, Richards K, Guilley H, Lecoq H, Jonard G . 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. Virology. 214: 150–158.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

Qian S, Chen X, Sun K, Zhang Y, Li Z. 2017. Capped antigenomic RNA transcript facilitates rescue of a plant rhabdovirus. Virology Journal. 14: 113.
Rabindran S, Robertson C, Achor D, German-Retana S, Holt CA and Dawson WO. 2005. Odontoglossum ringspot virus host range restriction in Nicotiana sylvestris maps to the replicase gene. Molecular Plant Pathology. 6: 439–447.
Ramirez BC, Garcin D, Calvert LA, Kolakofsky D, Haenni AL. 1995. Capped nonviral sequences at the 5'-end of the messenger RNAs of Rice Hoja-Blanca virus RNA4. Journal of Virology. 69: 1951-1954.
Scholthof HB, Gowda S, Wu F, Shepherd RJ. 1992. The full-length transcript of a caulimovirus is a polycistronic mRNA whose genes are transactivated by the product of gene VI. Journal of Virology. 66: 3131–3139.
Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, Sauro HM. 2010. In-fusion BioBrick assembly and reengineering. Nucleic Acids Research. 38: 2624–2636.
Tepfer M, Jacquemond M, Garcia-Arenal F. 2015. A critical evaluation of whether recombination in virus-resistant transgenic plants will lead to the emergence of novel viral diseases. New Phytologist. 207: 536– 41.
Tuo D, Fu L, Shen W, Li X, Zhou P, Yan P. 2017. Generation of stable infectious clones of plant viruses by using Rhizobium radiobacter for both cloning and inoculation. Virology. 99–103.
Van Bakoven H, Venver J, Wellinck J, Van Kammen A. 1993. Protoplasts transiently expressing the 200K coding sequence of cowpea mosaic virus BRNA support replication of M-RNA. Journal of General Virology. 74: 2233–2241.
Wang D, Cui L, Zhang L, Ma Z, Niu Y. 2021. Complete genome sequencing and infectious cdna clone construction of soybean mosaic virus isolated from Shanxi. The Plant PathologyJournal. 37(2): 162-172.
Whitby SM. 2001. The potential use of plant pathogens against crops. Microbes Infect. 3: 73–80.
WHO. 2004. Laboratory Biosafety Manual. 3rd ed., Geneva: WHO. Zarzy_nska-Nowak, A., Ferriol, I.¸Falk, B.W., Borodynko-Filas, N., Hasi_ow- Jaroszewska, B. (2017) Construction of Agrobacterium tumefaciensmediated tomato black ring virus infectious cDNA clones. Virus Research. 230:59–62.
Willemsen A, Swart MP. 2019. on the stability of sequences inserted into viral genomes. Virus Evolution. 5(2): vez045
Youssef F, Marais A, Faure C, Gentit P, Candresse T. 2011. Strategies to facilitate the development of uncloned or cloned infectious full-length viral cDNAs: apple chlorotic leaf spot virus as a case study. Virology Journal. 8: 488.
Zhang AP, Zhu HQ, Yu SQ, Yang L, Lou Y . 2002. Cloning of complete carnation mottle virus cDNA and its infectivity. Acta Horticulturae. 568(568): 149–154.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]

Application of Infectious Clones in Plant Virology

Fereshteh Esmaeilzadeh[1], Davoud Koolivand[2*]

1- Ph.D Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

koolivand@znu.ac.ir

Abstract

Plant viruses are important because of their threat to produce of crops products and also their application as research tools in molecular plant pathology and other fields in biotechnology is important. The most research and achivments in plant pathology depends on ability of plant's viral genomes to preserve, replicate and modify as infectious clones. The infectious clone is a full-length DNA clone in which infectious transcripts can be obtained *in vitro* or *in vivo* conditions with a suitable promoter. Infectious clones can be used to study the life cycle of viruses, replicate and express of viral genomes, understanding of virus-host interaction, functional genomics and germplasm screening as a part of pre-replication programs for virus resistance. However, the infectious clone of plant viruses may pose a risk to the environment due to its ability to return to the wild-type mode through recombination. This scientific review introduces the infectious clone in plant viruses and surveys the advantages and disadvantages of working with genetically modified plant viruses.

Keywords: Investigation of Virus Pathogenicity, Functional Genomics, Engineered Viruses, Cloning.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-07-11]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.1.3.0]