

Infekcyjne klony cDNA roślinnych wirusów

Ewa Sadowy
Włodzimierz Zagórski
Danuta Hulanicka
Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
Warszawa

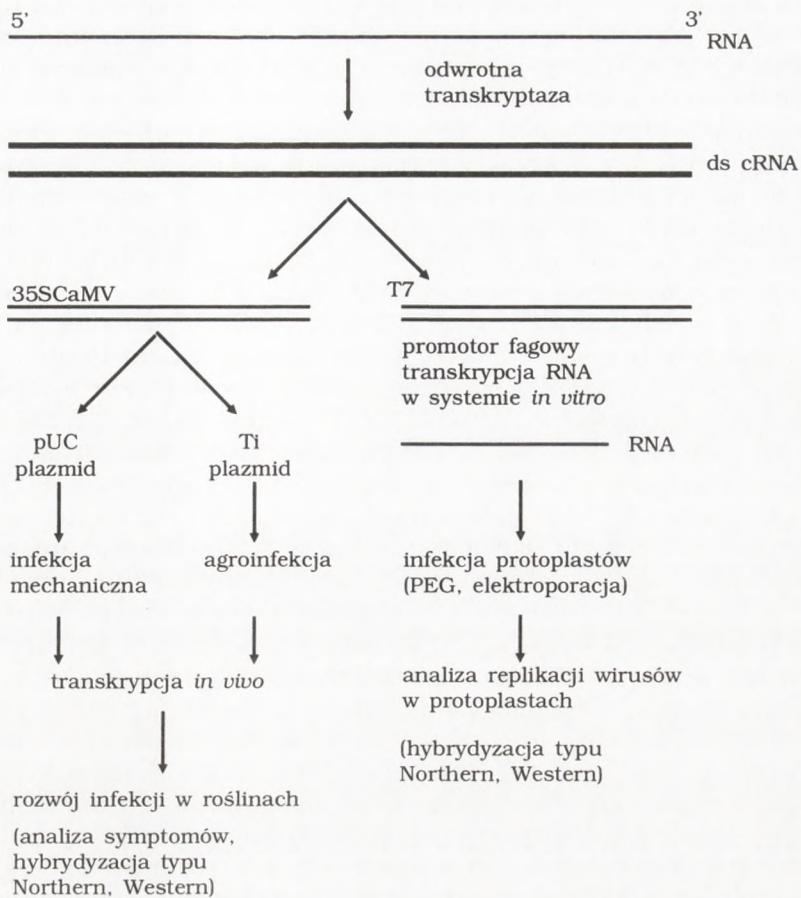
1. Wstęp

Wirusy, ze względu na niewielkie rozmiary swojego genomu, stanowią dogodny obiekt badań organizacji struktury i funkcji genów. Genomy ogromnej większości wirusów roślinnych, a także wirusów bakteryjnych (MS2, Q β) i zwierzęcych (pikornawirusy, koronawirusy, alfawirusy, flawiwirusy i in.) zbudowane są z RNA i w cyklu życiowym nie podlegają odwrotnej transkrypcji do DNA (1). Uniemożliwia to zastosowanie wielu technik inżynierii genetycznej do badań zarówno poznawczych jak i aplikacyjnych (2). Z tych względów wiedza molekularna o wirusach, których genom stanowi RNA, do czasu opracowania metody infekcyjnych klonów, polegającej na uzyskaniu pełnej kopii cDNA genomu wirusa, a następnie ich transkrypcji była stosunkowo niewielka (3). W szczególności opracowanie tych technik wpłynęło na pogłębienie wiedzy o wirusach roślinnych (4).

Tematem opracowania jest omówienie tych metod i ich zastosowanie. Postęp w tych badaniach umożliwił równoczesny rozwój innych metod, takich jak izolacja i transformacja protoplastów, czy wprowadzania materiału genetycznego za pośrednictwem naturalnych wektorów czy techniki tzw. armatki genowej (5,6).

2. Konstrukcje infekcyjnych klonów

Zasada konstrukcji infekcyjnych transkryptów jest prosta i została schematycznie przedstawiona na rys. 1 (7). Informacja genetyczna zawarta w genomie wirusa RNA zostaje przepisana do postaci cDNA. Wyizolowany genomowy RNA wirusa służy jako matryca do syntezy pierwszej nici cDNA przez odwrotną transkryptazę. Tak otrzymana pierwsza nić cDNA stanowi matrycę do syntezy drugiej nici cDNA, katalizowanej przez polimerazę DNA zależną



Rys. 1. Konstrukcja infekcyjnych klonów.

od DNA. W przypadku wirusów o krótkich podzielonych genomach możliwe jest jednostopniowe otrzymanie pełnej długości kopii cDNA po jednej reakcji syntezy. Zwykle jednak genomy wirusów roślinnych są większe niż 2-3 kb i konieczne jest składanie pełnej kopii z paru klonów, zawierających nakładające się fragmenty cDNA wirusa (8,9,10).

Do zsyntetyzowanego *in vitro* dwuniciowego cDNA, odpowiadającego pełnemu genomowi wirusa, dołącza się odpowiedni promotor i rekombinuje z plazmidem. W zależności od tego jaki rodzaj promotora zostanie użyty możemy rozróżnić dwie strategie konstrukcji infekcyjnych klonów: a) promotor fagowy — system RNA, b) promotor eukariotyczny — system DNA. Tak skonstruowana cząsteczka, zawierająca dwuniciowy cDNA genomu wirusa, umożliwia szybkie powielenie badanego materiału genetycznego, który można dowolnie modyfikować, a następnie badać wpływ wprowadzonych zmian na

proces replikacji, czy dalsze etapy cyklu życiowego wirusa. Na przykład mutacje w genach kodujących podjednostki replikazy będą interferować z powielaniem się RNA wirusa, mutacje w genie białka płaszczka uniemożliwią tworzenie cząstek wirusowych.

Konstrukcje infekcyjnych klonów schematycznie przedstawiono na rys. 1. W systemie RNA transkrypcja przeprowadzana jest przez fagowe polimerazy RNA *in vitro*. Otrzymany transkrypt, identyczny z genomem RNA wirusa, należy wprowadzić do protoplastów roślinnych. Obecność w protoplastach pełnego aparatu translacyjnego komórki roślinnej umożliwia replikację wprowadzonego transkryptu, powstawanie białek wirusowych i składanie wirionów. W przypadkach niektórych wirusów możliwa jest infekcja metodą mechaniczną całych roślin transkrypcyjnym syntetyzowanym *in vitro*.

Do śledzenia przebiegu poszczególnych etapów cyklu życiowego wirusa zastosowano różnorodne metody. Proces replikacji wirusa bada się zwykle stosując metodę Northerna, natomiast obecność białek wirusowych, czy wirionów stwierdza się za pomocą metod immunologicznych. System ten, historycznie starszy, po raz pierwszy opisany został dla bakteriofaga $\Phi\beta$ (11), a następnie dla wirusa mozaiki stokłosa BMV (7). Obecnie infekcyjne transkrypty znane są dla co najmniej 34 różnych wirusów roślinnych (8).

W systemie DNA, najczęściej stosowanym jest promotor wirusa 35S RNA mozaiki kalafiora, ulegający konstytutywnej ekspresji w roślinach. Pełną kopię cDNA genomu wirusa, zawartą między promotorem a terminatorem transkrypcji, wprowadza się do rośliny uszkadzając ją mechanicznie lub metodą armatki genowej (6). Infekcyjny klon można również wprowadzić do protoplastów. Obecność 35S RNA promotora umożliwi transkrypcję genomu wirusa *in vivo*. Aktywność biologiczną wprowadzonego klonu bada się tak jak w systemie RNA. Do tej pory opisano infekcyjne klony cDNA znacznie mniejszej liczby, bo około 10 różnych wirusów roślinnych (8,12).

Trudno zdecydowanie ocenić, który z opisanych systemów jest korzystniejszy. Niewątpliwą zaletą systemu DNA, w którym transkrypcja zachodzi *in vivo*, jest ominięcie procedur *in vitro*, co pozwala uniknąć pracy z RNA, materiałem łatwo ulegającym degradacji. Ponadto, synteza transkryptu *in vitro* jest procesem kosztownym, wymagającym zazwyczaj przeprowadzenia etapu dołączenia do 5' końca transkryptu czapeczki m⁷GpppG. Jednakże sama konstrukcja klonu z promotorem 35S jest trudniejsza, ze względu na wielkość promotora (około 1Kb), niż przyłączenie promotora fagowego. Inną zaletą systemu *in vivo* jest również możliwość bezpośredniego zakażenia rośliny wirusami przenoszonymi w przyrodzie tylko za pośrednictwem wektorów. W tym celu cDNA, odpowiadający genomowi wirusa, umieszczono w plazmidzie Ti, a następnie otrzymanym hybrydowym plazmidem transformowano *Agrobacterium tumefaciens*, naturalnego gospodarza plazmidów Ti. Transformowane bakterie wprowadzono do roślin, a proces ten nosi nazwę agroinfekcji. Technikę tę opracowano dla wirusa zachodniej żółtaczkki buraka (BWYV), przenoszonego jedynie przez mszyce (13). Wprowadzenie kopii genomu za pomocą agroinfekcji umożliwiło badanie kolejnych etapów cyklu życiowego tego wirusa w roślinie — gospodarza.

Infekcyjny klon tego wirusa otrzymano poprzednio (9) w systemie transkrypcji *in vitro* co spowodowało, że badania ograniczone były jedynie do poznania etapów replikacji i składania wirionu.

3. Czynniki wpływające na aktywność biologiczną klonów

Skonstruowanie kopii cDNA genomu wirusa dołączonej do promotora inicjującego transkrypcję *in vitro* lub *in vivo* nie jest jednoznaczne z otrzymaniem w pełni aktywnego biologicznie klonu. Po to by otrzymany transkrypt uległ replikacji i mógł wejść do dalszych etapów cyklu życiowego wirusa powinien być identyczny z wirusowym RNA, ponieważ te procesy wymagają licznych oddziaływań transkryptu z białkami komórkowymi, systemem translacyjnym gospodarza, jak i wirusowym kompleksem replikacyjnym.

Czynniki wpływające na aktywność biologiczną infekcyjnego klonu są:

- a) stopień heterogenności transkryptu,
- b) obecność mutacji punktowych,
- c) sekwencja nukleotydów 5' i 3' końców transkryptu,
- d) obecność czapeczki na 5' i sekwencji poli A na 3' końcu transkryptu.

Polimerazy RNA nie mają właściwości korektorskich (14), co może być przyczyną pojawiania się błędów w sekwencji samego transkryptu. Ponadto w czasie otrzymywania cDNA (przez odwrotną transkrypcję) i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) mogło zdarzyć się błędne wprowadzenie nukleotydów kreujące niekorzystne mutacje. Mutacje mogą spowodować brak infekcyjności uzyskanego klonu (14,15). Przypadki takie są niejednokrotnie opisywane w literaturze (16,17).

Poszczególne etapy konstrukcji kopii cDNA genomu wirusa, takie jak przyłączenie promotora, czy wprowadzanie na 3' końcu unikatowego miejsca restrykcyjnego, mogą spowodować obecność na 5' i 3' końcu obcych nie wirusowych sekwencji co ma duży wpływ na ostateczną aktywność biologiczną. Szczególne znaczenie mają sekwencje 5' końca (18,19) transkryptu, gdzie obecność nawet paru obcych nukleotydów obniża, a nawet niekiedy całkowicie znosi infekcyjność. Ciekawe, że obecność obcych w sekwencji nukleotydów przy transkrypcji *in vivo* jest znacznie lepiej tolerowana niż w przypadku infekcji transkryptem *in vitro*. W przypadku wirusa nekrozy żyłek buraka, klon, który zawierał 30 obcych nukleotydów przed 5' końcem genomu wirusowego ulegał *in vivo* replikacji, natomiast transkrypt otrzymany *in vitro* był całkowicie nieaktywny. Przedłużenie 3' końca o 1 do 7 nukleotydów nie ma wpływu na aktywność biologiczną.

W potomnych genomach „obce” nukleotydy na 5' i 3' końcu są usuwane i wielkość genomu w potomnych wirionach odpowiada wielkości naturalnej. Nie wiadomo, czy za tę korektę odpowiedzialne są nukleazy gospodarza, czy replikazy rozpoznające wewnętrzne miejsce inicjacji transkrypcji (1-9,16,21,22). Natomiast mutacje wewnątrz genomu, wprowadzane celowo lub przypadkowo, utrzymują się w potomnych wirusach, co umożliwia badanie ich wpływu na cykl życiowy wirusa i funkcje poszczególnych genów (23,24,25).

Obecność czapeczki na 5' końcu transkryptu podnosi, a niekiedy warunkuje infekcyjność transkryptu. Prawdopodobnie wiąże się z nią wydajniejsza translacja transkryptu oraz zwiększona jego stabilność w komórce roślinnej. W niektórych wirusach czapeczka może być zastąpiona przez wirusowe białko związane kowalencyjnie z 5' końcem genomu (Vpg — *Viral protein genome linked*).

W czasie transkrypcji *in vivo* może następować przedwczesna terminacja transkrypcji, powodująca w efekcie powstanie pewnej liczby krótszych transkryptów. Tego typu, niezdolne do samodzielnej replikacji, cząsteczki RNA współzawodniczą z cząsteczkami aktywnymi biologicznie o białka wirusowe i czynniki gospodarza, uczestniczące w namnażaniu wirusa.

Nie zawsze dla każdego wirusa możliwe jest uzyskanie infekcyjnego klonu. Niekiedy prawdziwym problemem staje się niestabilność pełnej kopii cDNA w bakteriach. Produkty genów niektórych wirusów są toksyczne dla bakterii i w trakcie replikacji rekombinowanego plazmidu powstają mutacje, które zapobiegają syntezie toksycznych produktów. Zjawisko to opisano w przypadku RNA2 wirusa nekrozy żyłek buraka. Problem ten udało się przezwyciężyć prowadząc transkrypcję *in vitro* pełnej długości cDNA bezpośrednio, unikając klonowania w bakteriach (26).

4. Zastosowanie infekcyjnych klonów

Sklonowanie w plazmidzie pełnej kopii genomu wirusa umożliwia nie tylko otrzymanie, praktycznie biorąc, dowolnej liczby kopii jego materiału genetycznego, ale również wprowadzenie mutacji i rearanżację genomu, a następnie badanie wpływu wprowadzonych zmian na cykl życiowy wirusa. Warto przypomnieć, że techniki inżynierii genetycznej nie mają zastosowania na poziomie RNA genomowego. Opracowanie wymienionych metod znacznie rozszerza zastosowanie infekcyjnych klonów, zwłaszcza jeśli się weźmie pod uwagę, że wyodrębnienie wirusów z rośliny sprawia niekiedy trudności. Pewne wirusy (np. wirus liściozwoju ziemniaka) namnażają się bowiem tylko w określonych tkankach i to w niewielkich ilościach (27).

Infekcyjnych klonów użyto w badaniach zmierzających ku:

- a) analizie funkcji genów i roli *cis* i *trans* elementów regulacyjnych,
- b) wykorzystaniu infekcyjnych klonów jako wektorów do ekspresji obcych genów,
- c) ustaleniu udziału białek i białkowych czynników komórek gospodarza w cyklu życiowym wirusa.

Bez wątplenia najwięcej nowych danych molekularnych przyniosły prace związane z analizą funkcji genów, na co przytoczyć można wiele przykładów.

Skonstruowanie infekcyjnego klonu wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV) zaopatrzonego w promotor faga T7 oraz wprowadzenie mutacji do ORFV i ORFVI klonu, udowodniły niezbędność produktów tych genów w replikacji wirusa (28).

Badacze francuscy ze Strasburga (8) otrzymali infekcyjny transkrypt innego wirusa z grupy *luteo* — BWYV. Wprowadzenie mutacji do ORF2 i ORF3 wykazało niezbędność ekspresji tych genów w replikacji wirusa i potwierdziło uprzednie przypuszczenie, że są to geny kodujące podjednostki polimerazy RNA zależnej od RNA. Analizując wiele delecji zaczynających się w ORF6, a sięgających aż do ORF4, wykazano, że delecyjne mutanty mogą się replikować, ale dla procesu składania cząsteczki wirusa niezbędne jest białko płaszczka — produkt ORF4.

W dalszych pracach badacze ci doprowadzili do konstrukcji klonu, w którym cDNA genomu wirusa dołączono do promotora 35S, co umożliwiło zakażenia roślin wirusem w drodze agroinfekcji (29). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że białko P74, złożone w części N-terminalnej z białka płaszczka i tzw. białka *read-through* (RT), powstającego w wyniku supresji stop kodonu oddzielającego gen białka płaszczka od następnego genu, jest niezbędne do przenoszenia wirusa przez mszyce. Mutacje w sekwencjach kodujących RT uniemożliwiają transmisję przez mszyce i mają również wpływ na akumulację wirusa w agroinfekowanych roślinach.

Podobne prace prowadzone były również w przypadku kilku innych wirusów i doprowadziły one do identyfikacji funkcji wielu genów (30). Pogłębienie wiedzy z zakresu biologii molekularnej wirusów bez wątpienia ułatwi prowadzenie prac mających na celu otrzymanie roślin opornych na infekcje wirusowe. Przykładowo: w infekcyjnym klonie wirusa mozaiki lucerny — AIMV (31) zidentyfikowano gen replikazy zależnej od RNA. W genie tym zmutowano sekwencję niezbędną do aktywności enzymatycznej białka i zmutowanym genem transfekowano lucernę, uzyskując rośliny odporne na AIMV (32).

Obiecującym zastosowaniem opisywanej, strategii, jak się wydaje, jest użycie infekcyjnych klonów jako wektorów do ekspresji obcych białek. W pracy (33), autorzy donoszą o wykorzystaniu kopii cDNA wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) do biosyntezy epitopów malarii. W tym celu włączono sekwencję nukleotydową kodującą wybrane epitopy do odpowiednich regionów cDNA genu białka płaszczka, a następnie syntetyzowanym *in vitro* transkryptem infekowano rośliny tytoniu. Chimeryczne wirusy namnażały się z nieco niższą wydajnością niż dzikie, ale biorąc pod uwagę szybkość przyrostu biomasy tytoniu, łatwość izolacji i oczyszczania wirionów, metoda ta może znacznie obniżyć koszt produkcji szczepionek i innych produktów peptydowych. W genomie potomnych wirionów potwierdzono obecność sekwencji kodujących epitop. Wiriony te są infekcyjne i chimeryczne wirusy można by wykorzystać do masowej produkcji szczepionek.

Wbudowanie epitopu w białko płaszczka wirusa TMV jest niezwykle wygodne, ponieważ proces oczyszczenia tego białka z wyodrębnionego wirionu jest łatwy i nie obarczony koniecznością eliminacji interferujących czynników. Innym przykładem zastosowania infekcyjnych klonów jako wektorów do roślin jest praca, w której autorzy donoszą o wprowadzeniu do genomu wirusa genu β -glukuronidazy (GUS) (34). Stwierdzono, że wprowadzony gen ulega ekspresji i białko to jest prawidłowo wycinane z poliproteiny wirusowej, zachowując pełną aktywność enzymatyczną. W tym przypadku, jest to do-

skonała metoda śledzenia dróg i kinetyki rozchodzenia się wirusa w tkankach roślinnych, ponieważ aktywność tego enzymu łatwo oznaczyć *in situ*.

Infekcyjne klonety wykorzystuje się również do badania roli czynników gospodarza zaangażowanych w procesy życiowe wirusa. Badania takie Ahlquist prowadził dla wirusa mozaiki stokłoty (BMV). Genom BMV składa się z trzech cząsteczek RNA, z których dwie kodują białka zaangażowane w replikację, a trzecia (RNA3) białko uczestniczące w przemieszczaniu się wirusa z komórki do komórki oraz białko płaszcza wirusowego (35).

Ze względu na bardzo dobrą znajomość genetyki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wykorzystano je do replikacji BMV (36). W pracy tej geny kodujące wirusowe białka replikacyjne, zlokalizowane na RNA1 i RNA2, wprowadzono do drożdży w plazmidach ekspresyjnych. Drożdże te następnie transformowano *in vivo* otrzymanym transkrypcyjnym klonem zawierającym cDNA RNA3 z wprowadzonym dodatkowo drożdżowym genem markerowym *ura*. Stwierdzenie replikacji RNA BMV w komórkach drożdżowych świadczy o obecności w nich wszelkich niezbędnych czynników uczestniczących w tym procesie. W przyszłości zastosowanie licznych mutantów drożdżowych może umożliwić identyfikację białek gospodarza niezbędnych do replikacji BMV.

5. Zagrożenia wynikające z rekombinacji RNA

Bez wątplenia technika infekcyjnych klonów będzie w niedalekiej przyszłości odgrywała coraz większą rolę, zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Trzeba zdawać sobie sprawę, że każdy postęp niesie ze sobą pewne zagrożenia. W ostatnich latach spotykamy coraz więcej przykładów związanych z zagrożeniami wynikającymi z niewłaściwym wprowadzaniem do praktyki nowych produktów czy technik.

Zagrożeniem jest tu możliwość rekombinacji między RNA wirusa niezależnie infekującego roślinę a RNA infekcyjnego klonu, czy RNA transgenu. Greene i Allison (37) wykazali zachodzenie rekombinacji między RNA infekcyjnego klonu wirusa chlorotycznej pstrzości wspięgi (CCMV) z częściową delecją w genie CP a RNA transgenu. Wprowadzany transkrypt CCMV ulegał replikacji, ale nie był zdolny do rozprzestrzeniania się w roślinie. Rekombinacja między dwiema cząsteczkami RNA umożliwiła powstanie wirusa zdolnego do systemicznego rozchodzenia się w roślinie.

W literaturze istnieje wiele innych przykładów na zachodzenie rekombinacji między RNA. Zaobserwowano (38) rekombinację między defektywnymi interferującymi (DI) RNA wirusa krzaczastości pędów pomidora a niepełnej długości RNA wirusa nekrozy ogórka. Rekombinacja miała miejsce między niereplikującymi się RNA i doprowadziła do powstania w pełni zdolnych do replikacji chimerycznych cząstek RNA wirusowego.

Ocena stopnia zagrożenia i zastanowienie się jakie środki ostrożności powinny być podjęte zanim infekcyjne klonety, czy transgeniczne rośliny zostaną powszechnie wprowadzone jest zadaniem dla naukowców, którzy wypracowują te techniki badań na skalę laboratoryjną.

6. Podsumowanie

Technika infekcyjnego klonu genomu wirusa znacznie rozszerzyła naszą wiedzę o biologii molekularnej wirusów roślinnych. W pracy omówiono system transkrypcji *in vitro* i *in vivo*, jak również czynniki wpływające na aktywność biologiczną skonstruowanego klonu. Zastosowanie tej techniki nie ogranicza się do badań poznawczych, ale również ma zastosowanie w badaniach aplikacyjnych.

Literatura

1. Matthews R. E. F., (1991), *Plant Virology*, Academic Press, New York.
2. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1982), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
3. Zaccomer B., Haenni A.-L., Macaya G., (1995), *J. of Gen. Virol.*, 76, 231-247.
4. Bujarski J. J., Miller W. A., (1992), *Genetic Engineering with Plant Viruses*, Eds. T. M. A. Wilson, J. W. Davies, CRC Press, Boca Raton, FL, 115-147.
5. Watanabe J., Meshi T., Okada Y., (1987), *FEB*, 219, 65-69.
6. Sautter C., Waldner H., Neuhaus-Url G., Galli A., Neuhaus G., Potrykus I., (1991), *Bio/Technology*, 9, 1080-1085.
7. Ahlquist P., French R., Janda M., Loesch-Fries L., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81, 7066-7070.
8. Boyer J.-Ch., Haenni A. L., (1994), *Virology*, 198, 415-426.
9. Reutenauer A., Ziegler-Graff V., Lot H., Scheidecker D., Guilley H., Richards K., Jonard G., (1993), *Virol.*, 195, 692-699.
10. Ahlquist P., French R., Bujarski J. J., (1987), *Adv. Virus Res.*, 32, 215-242.
11. Tanigushi T., Palmieri M., Weissmann C., (1978), *Nature*, 274, 2293-2298.
12. Ding S.-W., Rathjen J. P., Li W.-X., Swanson R., Healy H., Symons R. H., (1995), *J. of G. Virol.*, 76, 459-464.
13. Leiser R.-M., Ziegler-Graff V., Reutenauer A., Herrbach E., Lemaire O., Guilley H., Richards K., Jonard G., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 9136-9140.
14. Domingo E., Holland J. J., (1992), *Evolutionary Biology of Viruses*, Ed. S. S. Morse, Raven Press.
15. Hamilton W.D.O., Baulcombe D. C., (1989), *J. Gen.Virol.*, 70, 963-968.
16. Kuhn R. J., Niesters H. G. M., Hong Z., Strauss J. H., (1991), *Virol.*, 182, 430-441.
17. Eggen R., Verver J., Wellink J., de Jong A., Goldbach R., van Kammen A., (1989), *Virol.*, 173, 447-455.
18. Holt C. A., Beachy R. N., (1991), *Virol.*, 181, 109-117.
19. Rizzo T. M., Palukaitis P., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 222, 249-256.
20. Heaton L. A., Carrington J. C., Morris T. J., (1989), *Virol.*, 170, 214-218.
21. Commandeur U., Jarausch W., Li Y., Koenig R., Burgermeister W., (1991), *Virol.*, 185, 493-495.
22. Mori M., Mise K., Kobayashi K., Okuno T., Furosawa I., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 243-246.
23. Viry M., Serghini M. A., Hans F., Ritzenthaler C., Pinck M., Pinck L., (1993), *J. Gen. Virol.*, 74, 169-174.
24. Weber H., Haeckel P., Pfltzner A. J. P., (1992), *J. Virol.*, 66, 3909-3912.
25. Lai C. J., Zhao B., Hori H., Bray M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 5139-5143.
26. Quillet L., Guilley H., Jonard G., Richards K. (1989), *Virol.*, 172, 293-301.
27. Mayo M. A., Baker H., Robinson D.J., Tamada T., Harrison B. D., (1982), *J. Gen. Virol.*, 59, 163-167.

28. Young M. J., Kelly P. J., Larkin P. J., Waterhouse P. M., Gerlach W. L., (1990), *Viol.*, 180, 372-379.
29. Brault V., van den Heuvel J. F. J. M., Verbeek M., Ziegler- Graff V., Reutenauer A., Herrbach E., Garaud J.-C., Guilley H., Richards K., Jonard G., (1995), *The EMBO Journal*, 14, 650-659.
30. van der Kuyl A. C., Neeleman L., Bol J. F., (1991) *Viol.*, 183, 687-694.
31. Taschner P. E., van der Kuyl A. C., Neeleman L., Bol J. F., (1991), *Viol.*, 181, 445-450.
32. Brederode F. Th., Taschner P. E. M., Posthumus E., Bol J. F., (1995), *Viol.*, 207, 467-474.
33. Turpen T. H., Reini S. J., Charoenvit Y., Hoffman S. L., Fallarme V., Grill L. K., (1995), *Bio/Technology*, 13, 53-57.
34. Dolja V. V., McBride H. J., Carrington J. C., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, 10208-10212.
35. Ahlquist P., French R., Bujarski J. J., (1987), *Adv. Virus Res.*, 32, 215-242.
36. Janda M., Ahlquist, (1993), *Cell*, 72, 961-970.
37. Greene A. E., Allison R. F., (1994), *Science*, 263, 1423-25.
38. White K., Morris T. J., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91, 3642-3646.

Infectious cDNA clones of plant viruses

Summary

Obtaining of infectious clones (as cDNAs or as *in vitro* — transcribed RNA copies) corresponding to the genomes of RNA viruses has greatly enhanced investigations. The different strategies employed to construct infectious clones from plant RNA virus and parameters affecting infectivity of such clones have been described.

The system represents a powerful tool for studying plant virus replication, short and long distance virus movement and the virus — host interactions. It may serve as autonomously replicating vectors for the expression of foreign genes in plants.

Key words:

RNA virus, plant virus, infectious clone.

Adres do korespondencji:

Ewa Sadowy, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a,
02-106 Warszawa.