

انتقال ژن ضد قارچی *NaD1* برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی

Gossypium در پنبه (*Fusarium oxysporum* و *Verticillium dahlia*)
(*hirsutum*)

Transgenic cotton expressing synthesized antifungal *NaD1* gene
confers enhanced resistance to fusarium wilt and verticillium wilt

رسمیه حمید^۱، سید حسن مرعشی^{۱*}، مسعود توحیدفر^۲، سعید ملک زاده شفارودی^۱

۱- به ترتیب دکتری، استاد، دانشیار، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

فردوسی، مشهد، ایران

۲- دانشیار، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی فناوری های نوین

Hamid R¹, Marashi H^{*1}, Tohidfar M², Malekzadeh-shafaroudi S¹

1. PhD, Professor, Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant
Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

2. Associate Professor, Science and biotechnology faculty, Shaid beheshti

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: marashi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۳)

چکیده

پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان اقتصادی است که ستون اصلی صنعت نساجی در جهان را تشکیل می‌دهد. با وجودی که بسیاری از مشکلات زراعت پنبه به وسیله اصلاح نباتات سنتی حل شده است، اما هنوز آفات و بیماری‌های قارچی خسارات گسترده‌ای به کیفیت و کمیت این محصول وارد می‌کنند. پژمردگی ورتیسلیومی و فوزاریومی از مخرب‌ترین بیماری‌های شایع پنبه به شمار می‌روند. پروتئین مقاومت گیاهی *NaD1*، از *Nicotiana glauca*، دارای فعالیت ضد قارچی قوی در برابر طیف وسیعی از قارچ‌های رشته‌ای از جمله دو پاتوژن قارچی مهم پنبه، *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Fov) و پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticillium dahliae*) است. در این پژوهش با استفاده از آگروباکتریوم پنبه‌های تراریخته حامل ژن *NaD1* تحت پیشبر CaMV 35S تولید شدند. نتایج آنالیز PCR و RT-PCR نشان می‌دهد که ژن *NaD1* در ژنوم پنبه درج شده و بیان می‌شود. در مقایسه با گیاهان شاهد پنبه‌های تراریخته‌ای که ژن *NaD1* را بیان می‌کنند، به پاتوژن *Verticillium dahliae* مقاومت نشان دادند. پنبه‌های مقاوم به پژمردگی ورتیسلیومی تولید شده در این پژوهش می‌توانند منابع خوبی برای برنامه‌های اصلاحی تولید ارقام مقام به بیماری‌ها باشند. توسعه چنین ارقامی می‌تواند در کاهش خسارات ناشی از بیماری‌های قارچی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم

پنبه

ژن *NaD1*

Fusarium oxysporum
Verticillium dahliae

مقدمه

بیماری‌های قارچی از تهدیدات جدی در امنیت تولید غذا در جهان هستند (Wilson et al. 2010) و یکی از عوامل اصلی در کاهش محصول گیاهان زراعی می‌باشند (Fisher et al. 2012). روش‌های سنتی در کنترل پاتوژن‌های قارچی عمدتاً شامل روش‌های کنترل بیولوژیک همچون انتخاب ارقام مقاوم، تناوب زراعی، جمع‌آوری بقایا و روش‌های کنترل شیمیایی است (Lin et al. 2011). بیماری‌های قارچی ورتیسیلیوز (*Verticillium dahlia*) و پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum*) از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی پنبه می‌باشند که سالیانه خسارت زیادی وارد می‌کنند و تقریباً در تمامی اراضی تحت کشت پنبه مشاهده می‌شوند، این بیماری‌ها سبب کاهش ۴/۸۷ درصدی در تعداد غوزه، ۸/۳۸ درصدی در وزن غوزه و ۲/۹۲ درصدی در عملکرد بذر پنبه می‌شوند (Klosterman, Atallah et al. 2009, Geiser, Aoki et al. 2013). *V. dahliae* عامل بیماری ورتیسیلیوز یک پاتوژن خاکزی است که سیستم آوندی گیاه را مورد هجوم قرار می‌دهد و دامنه میزبانی وسیعی دارد به‌طوری که بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی را هدف قرار می‌دهد. مؤثرترین روش در کنترل بیماری‌های فوزاریوم و ورتیسیلیوز استفاده از ارقام متحمل است (Yang et al. 2015). روش‌های اصلاح نباتات سنتی و شیمیایی در کنترل بسیاری از پاتوژن‌های قارچی مؤثر واقع شده‌اند، اما هنوز خسارت ناشی از بیماری‌های قارچی در کشاورزی مدرن به‌علت استفاده از ارقام حساس، عوامل نامساعد محیطی و روش‌های غلط زراعی بسیار زیاد است. علاوه بر این استفاده از قارچ‌کش‌ها باعث آلودگی محیط زیست و افزایش هزینه‌های عملیات کشاورزی می‌شود (Lay et al. 2003). کاربرد اخیر گیاهان تراریخته در کنترل آفات و علف‌های هرز رویکرد استفاده از گیاهان مقاوم به پاتوژن‌های قارچی را پدید آورده است. استفاده از مهندسی ژنتیک با رویکرد انتقال ژن‌های مقاومت برای ایجاد ارقام مقاوم به بیماری ورتیسیلیوز نتایج متنوعی داشته است (Juturu et al. 2015). ژن‌های مورد استفاده برای این مطالعات شامل *NPR1.GbVe* آرآیدوپسیس (Zhang et al. 2012) ژن ضد آپوپتوز *p35* (Wijayanto et al. 2009) و ژن القا کننده پاسخ فوق حساسیت *Hpa1Xoo* (Choi et al. 2012) و بعضی از ژن‌های ضد

قارچی شامل کیتیناز (Jach et al. 1995) گلوکوناز (Esfahani et al. 2010)، *D4E1* (Attilio et al. 2013)، بازدارنده‌های پروتئازی (Charity et al. 2005)، تیونین‌ها (Eppl, Apel et al. 1997, Chan et al. 2005, Oard and Enright 2006) و پروتئین‌های مقاومت (Terras et al. 1995, Gao et al. 2000) می‌باشند. سطوح مقاومت در گیاهان ترانسژن حاصل، دامنه‌ای از سرکوب کامل رشد عامل قارچی در تماس با عصاره گیاهان ترانسژن (Noman et al. 2016)، تا افزایش جزئی مقاومت به بیماری در شرایط زراعی یا افزایش مقاومت به سویه‌های ضعیف پاتوژن بوده است (Juturu et al. 2015). به‌عنوان مثال میزان رشد کنیدی *V. dahlia* به‌طور معنی‌داری در تماس با عصاره گیاه ترانسژن حاصل از انتقال ژن *D4E1* کاهش یافته است. اما این مقاومت در شرایط مزرعه‌ای مشاهده نشد (Kamo et al. 2015). مؤثرترین روش در ایجاد ارقام مقاوم به پاتوژن‌های قارچی، انتقال پروتئین‌های مقاومت است. پروتئین‌های مقاومت به‌طور گسترده‌ای در میان گونه‌های مختلف گیاهان پراکنده‌اند و در بافت‌های مختلف بیان می‌شوند (Lay and Anderson 2005). این پروتئین‌ها معمولاً کوچک، پایه‌ای و دارای چهار باند دی‌سولفیدی هستند که به آن‌ها ساختار بسیار پایدار و حفاظت شده‌ای می‌دهد (Gaspar et al. 2014). این پروتئین‌ها را می‌توان براساس حضور یا عدم حضور پروپتید C-terminal (CTPP) در دو گروه دسته‌بندی کرد (Lay and Anderson 2005). پروتئین مقاومت *NaD1* یکی از پروتئین‌های شناخته شده ضدقارچی با منشا توتون زینتی (*Nicotiana glauca*) است. این پروتئین متعلق به گروه دوم پروتئین‌های مقاومت است که متشکل از یک توالی سیگنال ۲۵ آمینواسیدی، دمین ۴۷ آمینواسیدی پروتئین بالغ مقاومت و یک CTPP چهار و هفت آمینواسیدی است (Hayes, Bleackley et al. 2013). این پروتئین در محیط *in vitro* مانع از جوانه‌زنی و رشد اسپورهای قارچ چندین پاتوژن مهم کشاورزی می‌شود (McKenna et al. 2004). پروتئین‌های مقاومت چین خوردگی مشابهی دارند اما به لحاظ توالی بسیار متنوع‌اند، و همچنین به لحاظ مکانیسم عمل نیز ممکن است متنوع باشند (Lay et al. 2003). نقش پروتئین‌های مقاومت در سیستم دفاعی گیاهان بسیار شناخته شده است (Kaur et al. 2011). محققین با استفاده از

باکتری و ناقل‌های مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری‌های *E. coli* سویه XILblue (Cinna Gen B16-50c) و اگر و باکتریوم سویه LBA4404 (مقاوم به ریف آمپسین) استفاده شد. هم‌چنین از سازه‌های *pGH* دارای ژن سیستک *NaD1* و (Clontech, Washington, DC) *pBI121* دارای ژن *gus* و نشانگر انتخابی کانامایسین استفاده شد. آنزیم و محلول‌های مورد نیاز برای واکنش PCR از شرکت سیناژن و شرکت فرمنتاز تهیه شدند. تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش اتصال و هضم و انتقال محصول به باکتری‌های مستعد و هم‌چنین استخراج DNA پلاسمیدی مطابق با دستورالعمل (Russel Sambrook 2000) انجام شد. خالص‌سازی قطعات از روی ژل با استفاده از کیت (Roche)، High Pure PCR Purification انجام شد.

ساخت ژن *NaD1* و سازه ژنی: در ابتدا توالی ژن *NaD1* (GenBank accession number AF509566) از پایگاه NCBI دریافت شد. توالی cDNA آن انتخاب شد، در مرحله بعد با توجه به اینکه کدون‌های ترجیحی موجود هدف تاثیر مثبتی در افزایش بیان ژن دارند (Wu et al. 2008). با استفاده از نرم‌افزار (Thermo Fisher Scientific -US) vector NTiTM 11 بهینه‌سازی کدونی انجام شد. قبل از کدون شروع یک توالی ۲۸ نوکلئوتیدی (شکل ۱، جدول ۱) به‌عنوان عامل تقویت‌گر^۱ مطابق با بررسی‌های انجام شده اضافه شد (Joshi 1987, Kanoria and Burma 2012). هم‌چنین جایگاه‌های برشی آنزیم‌های (XbaI) و (SacI) جهت همسانه‌سازی ژن درون ناقل (*pBI121*) Clontech, Washington, DC) به توالی مورد نظر اضافه شد. در نهایت توالی به‌صورت سیستک توسط شرکت ندای فن ساخته شد. ژن *NaD1* به‌همراه توالی عامل تقویت‌گر اضافه شده به آن با استفاده از جایگاه‌های برشی XbaI و SacI از حامل *pGH* جداسازی و پس از خالص‌سازی از ژل یک درصد در حامل *pBI121* که ژن *gus* آن با هضم آنزیمی جدا شده بود، کلون شد. حضور ژن در حامل مذکور با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن تایید شد، سازه نوترکیب حاصل سپس به اگر و باکتریوم سویه LBA 4404 (حاوی سازه مقاوم به آنتی بیوتیک ریف آمپسین 75 mg/l) منتقل شد، سازه حاصل در سایر مراحل انتقال ژن مورد استفاده قرار

تکنیک‌های مختلف مهندسی ژنتیک تلاش‌های فراوانی جهت ایجاد مقاومت به این بیماری‌های قارچی کرده‌اند (Miao et al. 2010). با وجودی که این ژن‌ها تنها مقاومت در سطح *in vitro* را ایجاد کرده‌اند، ارقام ترانسژن حاصل از انتقال ژن *NaD1* در شرایط مزرعه‌ای نسبت به دو بیماری پژمردگی فوزاریومی و وریسیلیومی سطح مقاومت اقتصادی نشان داده‌اند (Gaspar et al. 2014, Wang et al. 2016). در مطالعه حاضر ژن *NaD1* تحت پروموتور 35S با استفاده از *A. tumefaciens* به ارقام تجاری پنبه منتقل شد، هم‌چنین بیان این ژن و میزان مقاومت ارقام تراریخته حاصل در سطح *In Vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

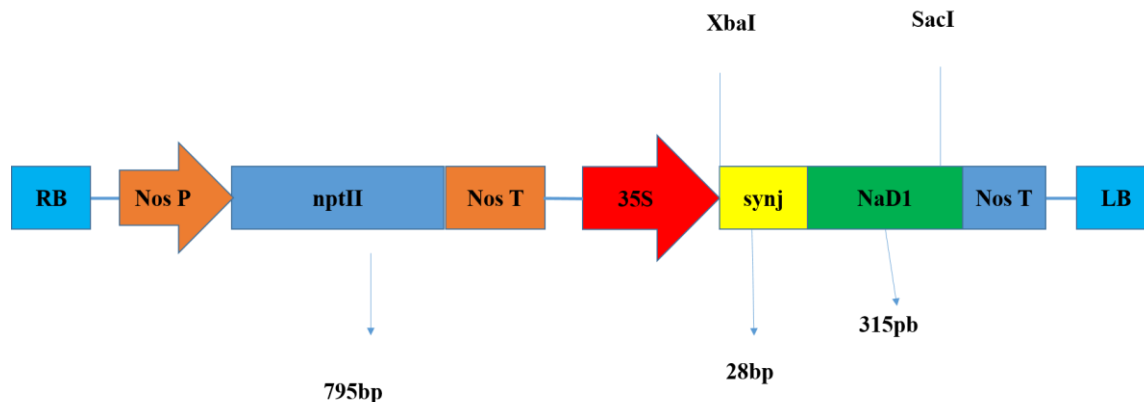
مواد گیاهی، ضد عفونی و جداسازی مریستم: ارقام تجاری پنبه (خورشید و ورامین) از مؤسسه تحقیقات پنبه کشور تهیه شدند. هر چند این ارقام از جمله ارقام پرمحصول کشور به شمار می‌روند اما به بیماری وریسیلیوز حساس هستند (Yang et al. 2018). به‌منظور ضد عفونی، ابتدا کرک‌زدایی بذور با استفاده از شستشو با اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) و به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد، سپس بذور با استفاده از آب شهری به مدت ۴۰ دقیقه آب‌شویی شدند. پس از آن با استفاده از الکل ۷۰ درصد بذور به مدت یک دقیقه شستشو داده شده، و پس از آن در وایتکس ۲۰ درصد و به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در انتها بذور با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل ۵ بار به‌خوبی آبکشی شدند، و بر روی کاغذ استریل خشک شدند. پس از آن در هر لوله آزمایش حاوی محیط جوانه‌زنی (1/2MS)، ۳-۴ بذر قرار داده شد، سپس لوله‌ها در اتاق کشت با دمای (۲۵±۲) درجه و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. جداسازی مریستم از گیاهچه‌های ۳-۴ روزه مطابق روش (Zapata et al. 1999) صورت گرفت. در این روش پس از جداسازی برگ‌های کوتیلدنی به‌کمک سوزن‌های باریک دو برگ اولیه جدا، و مریستم که بین این دو برگ است جداسازی شد. مریستم‌های جداسازی شده تا زمان تلقیح بر روی محیط پیش کشت (MS+ B5, 0.1 mg/L 6-BA, + 2.5 g/l phytag) قرار داده شدند (۳-۴ ساعت).

¹ Enhancer

هم‌کشتی (MS+ B5 Vit+ 1 mg/l BAP+ 3% Glucose+ 200mg/l aceto) که یک کاغذ صافی بر آن قرار داده شده بود منتقل شدند، و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی در دمای ۲۸ درجه گرمادهی شدند (Ma et al. 2013). پس از اتمام مدت زمان هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی استریل به‌خوبی خشک شدند و به محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی کانامایسین (MS+ B5, 0.1 mg/L NAA, 0.1 mg/L 6-) و هم‌چنین غلظت‌های (BA, +90mg/l Kan + 2.5 g/l phytag) ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر سفاتاکسیم و ۲۰۰ میلی گرم کربنی‌سیلین (به‌منظور کنترل آلودگی آگروباکتریوم) در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه منتقل شدند. ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار واکشت^۱ شدند.

گرفت (شکل ۱). به‌منظور تلقیح ریزنمونه‌ها، ابتدا یک تک کلون از کشت تازه جامد آگروباکتریوم با استفاده از نوک سرتیپ برداشته شد، و در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین 50 mg/l و ریف‌آمپسین 75 mg/l در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری کشت شد. کشت در شیکر انکوباتور با دور 185 rpm در دمای ۲۸ درجه به مدت یک شب (۱۶ ساعت) قرار داده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از این کشت برداشته و در ۵۰ میلی‌لیتر LB مایع به‌همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریف‌آمپسین کشت داده شد پس از ۴ ساعت باکتری رسوب داده شد و رسوب در محیط شامل MS مایع به اضافه ۷۵ میلی‌مولار MES به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کایتین و دو درصد گلوکز و غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد (PH محیط بر روی ۵/۴ تنظیم شد). تلقیح به روش غوطه‌ورسازی ریزنمونه‌ها در مایع تلقیح و شیک در انکوباتور در مدت زمان ۲۰ دقیقه صورت گرفت. پس از تلقیح ریز نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی خشک شدند و پس از خشک شدن به‌صورت عمودی و رو به بالا بر روی محیط

¹ Subculture



شکل ۱- شکل شماتیک سازه حاوی ژن *NaD1*، ژن *NaD1* که شامل توالی ۳۱۵ جفت‌بازی است و تحت پروموتور 35S و ترمیناتور Nos است، *Synj* توالی ۲۸ جفت‌بازی Enhancer و *XbaI* و *SacI* جایگاه‌های آنزیم‌های برشی مورد استفاده برای کلون ژن *NaD1* در پلاسمید نوترکیب pBI121، pII ژن مقاومت به کانامایسین تحت پروموتور و ترمیناتور Nos

جدول ۱. توالی آغازگرهای به‌کار رفته برای ژن *NaD1* به‌همراه توالی عامل تقویت‌گر

	Forward	Reverse	
NaD1	CTTCATGGCTTTTCGCTATTCTTG	ACCAGTCTTAGTCATCTTTTCATCG	۲۲۱
Enhancer	ACACGCTGGAATTCTAGTATACTAAACC		۲۸

روش kan-painting (آغشته کردن برگ با کانامایسین): در این روش به منظور شناسایی گیاهان تراریخته از طریق بررسی بیان کانامایسین، اولین برگ حقیقی گیاهان حاصل از کشت نتاج گیاهان تراریخته (گیاهان T1) با استفاده از قلم موی آغشته به کانامایسین، مورد تیمار قرار گرفت. غلظت استفاده شده برای تایید تراریخته‌گی مشابه غلظت استفاده شده در محیط انتخابی و برابر 90 mg/L بود. در این آزمایش انتظار می‌رفت که پس از به کار بردن کانامایسین بر روی اولین برگ حقیقی گیاهان مختلف، برگ گیاه غیر تراریخته نکروزه شده اما برگ گیاهان تراریخته شاداب و سبز بماند.

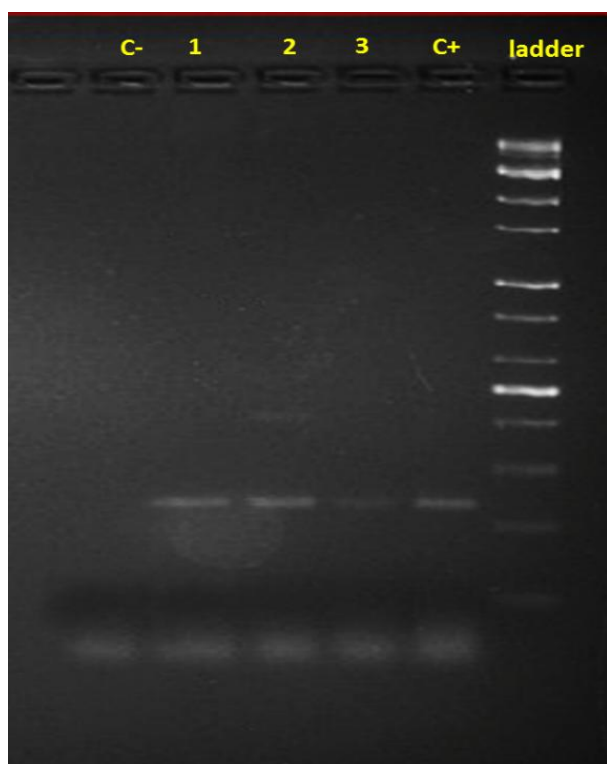
زیست‌سنجی قارچ: برای تهیه عصاره پروتئینی گیاهان، برگ‌های جوان گیاهان تراریخته و شاهد با ازت مایع پودر شد. با استفاده از محلول استات سدیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=5) عصاره پروتئینی استخراج شد (به هر ۱۰۰ میلی‌گرم برگ ۲۰۰ میکرولیتر بافر اضافه شد سپس مخلوط حاصل سانتریفیوژ، و مایع رویی که شامل عصاره پروتئینی گیاه بود جداسازی شد). پس از رشد کافی قارچ *V. dahlia* در محیط کشت PDA³، ابتدا با استفاده از نوک سرتیپ استریل خراش‌هایی در سطح کشت ایجاد شد سپس به هر پتری‌دیش کشت قارچی یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سپس از این مخلوط میکروکنیدی‌ها، رقت 10^{-6} X spores/ml تهیه شد. سپس از این رقت یک میلی‌لیتر برداشته و بر روی محیط PDA به‌خوبی پخش شد، و اجازه داده شد مخلوط کنیدی و آب مقطر کاملاً جذب محیط کشت شود این کار چهار بار تکرار شد. سپس در هر پتری‌دیش چاهک‌هایی به قطر ۵/۵ میلی‌متر با فاصله یکسان ایجاد شد. عصاره پروتئینی گیاهی شامل عصاره‌ی پروتئینی گیاه شاهد و عصاره‌ی پروتئینی گیاه تراریخته در غلظت‌های مختلف (۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته، ۲۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۸۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته، ۸۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته، ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته) به درون چاهک‌ها اضافه شد، سپس درب پتری‌دیش‌ها

آنالیزهای مولکولی: DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان باززا شده در محیط انتخابی، به روش CTAB با اندکی تغییرات استخراج شد (Soni and Murray 1994). حضور ژن *Nad1* از طریق آغازگرهای اختصاصی مورد تایید قرار گرفت. پلاسمید *pBi121* نوترکیب به‌عنوان کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخته و مواد واکنش PCR بدون DNA به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شدند. واکنش فوق در شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و تکمیل بسط به مدت ۳ دقیقه) انجام شد، هم‌چنین از آغازگرهای ژن *Vir* برای تایید عدم آلودگی با آگروباکتریوم استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش RT-PCR: استخراج RNA از ۴ گیاه تراریخته تصادفی رقم خورشید و یک گیاه تیپ وحشی (گیاه غیر تراریخته، رقم خورشید) طبق پروتکل (Wu et al. 2002) و همراه با تیمار DNase انجام شد. سنجش کمی و کیفی RNAهای استخراج شده، با استفاده از نسبت OD260/ OD280 تعیین شد، علاوه بر این جهت سنجش کیفی RNAهای استخراج شده، یک میکرولیتر از هر استخراج بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. رونویسی معکوس از روی RNAها به کمک آنزیم ترانس کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای تصادفی dT و هم‌چنین آغازگر برگشتی^۱ اختصاصی ژن *Nad1* انجام گرفت. cDNA حاصل بعد از رقیق‌سازی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. برای بررسی کیفیت و هم‌چنین همسانی غلظت cDNAهای حاصل ابتدا از آغازگرهای یک ژن مرجع^۲ به نام ۱۶srRNA در واکنش PCR استفاده شد و نتیجه‌ی واکنش بر روی ژل آگارز بررسی شد، ژن مرجع باید در تمام نمونه‌ها به میزان یکسانی بیان گردد، بنابراین شدت باند حاصل از واکنش PCR روی cDNAهای مختلف باید یکدست باشد. سپس PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Nad1* تحت شرایط ذکر شده انجام شد. در نهایت محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد تفکیک شد.

¹ reverse² housekeeping³ Potato Dextrose Agar

به منظور بررسی بیان ژن انتقال یافته در گیاهان پنبه تراریخته، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *NaD1* و cDNA حاصل از گیاهان تراریخته و شاهد واکنش PCR انجام شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR مطابق شکل (۵) نشان داد که ژن *NaD1* حداقل در رویدادهای ۲ و ۴^۱ رقم خورشید بیان می شود. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش PCR روی cDNA گیاهان شاهد (غیر تراریخته) با همان شرایط، باندی نشان نداد. قابل ذکر است که جهت بررسی عدم آلودگی DNA، واکنش PCR بر روی RNAهای استخراج شده از گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *NaD1* انجام شد و نتایج الکتروفورز محصول PCR نشان داد که هیچ یک از نمونه های RNA آلودگی DNA ندارند (برای ژن *NaD1* هیچ باندی مشاهده نشد).



شکل ۲- نتایج حاصل از آنالیز کلونی PCR؛ C⁻ کنترل منفی، ۱-۳ کلونی های مورد آزمایش، C⁺ کنترل مثبت که شامل پلاسمید PGH می باشد، و Ladder نشانگر ملکولی ۱kb plus

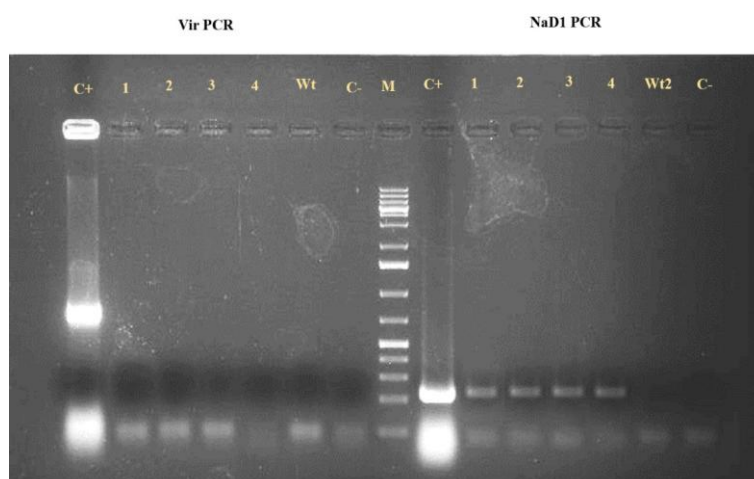
بسته و به مدت ۱۲۰ ساعت در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (McKenna et al. 2004). در نهایت فعالیت آنتاگونیست عصاره گیاهی بر علیه قارچ *V. dahlia* با اندازه گیری قطر هاله ایجاد شده در اطراف هر چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت، شایان ذکر است که آزمایش برای هر رقت در چهار تکرار انجام شد (Kharazian et al. 2017).

تجزیه تحلیل آماری: کلیه ی آزمایش ها در چهار تکرار انجام شدند. تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با استفاده از SAS (نسخه ۹٫۱)، و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن ($P < 0.01$) انجام شد.

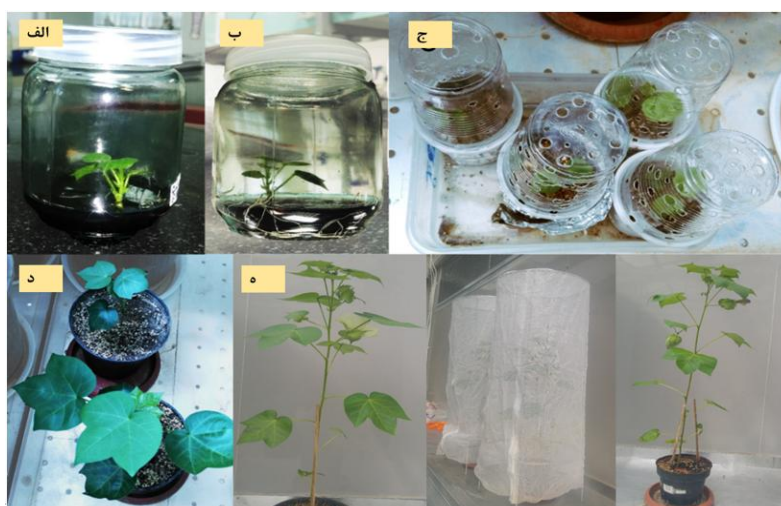
نتایج

پلاسمید نو ترکیب *pBI121* حاوی ژن *NaD1* با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت. الگوی هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *SacI*، وجود ژن *NaD1* را در پلاسمید *pBI121* مورد تایید قرار داد. همچنین الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، حضور این ژن را در پلاسمید *pBI121* مورد تایید قرار داد (شکل ۲). سازه ژنی *pBI121* به آگروباکتریوم منتقل و پس از تایید، جهت تراریخته گی ریزنمونه های مریستم استفاده شد. گیاهانی که پس از ۸ هفته در محیط انتخابی زنده ماندند. برای تایید تراریختگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *NaD1* و آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جهت بررسی عدم آلودگی نمونه ها به آگروباکتریوم از آغازگرهای *Vir* و آزمون PCR استفاده شد (شکل ۳). گیاهانی که برای PCR ژن *NaD1* مثبت و برای PCR ژن *Vir* منفی بودند به عنوان گیاهان تراریخته انتخاب شدند و به گلدان منتقل شدند (شکل ۴). از گیاهان رشد یافته پس از گلدهی بذریگیری به عمل آمد. در ادامه گیاهان T1 ترانسژن از طریق بررسی بیان کانامایسین با استفاده از روش kan-painting شناسایی شدند. پس از به کار بردن کانامایسین بر روی اولین برگ حقیقی گیاهان، برگ گیاه غیر تراریخته نکروزه شده اما برگ گیاهان تراریخته شاداب و سبز ماند. همچنین برای تایید بیشتر گیاهان مقاوم به کانامایسین، PCR برای ژن *NaD1* انجام شد.

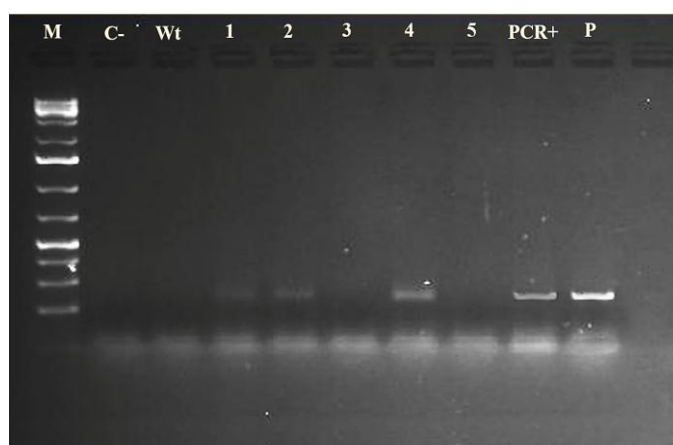
¹ Events number 4 and 2



شکل ۳- نتایج حاصل از آنالیز: PCR⁻ کنترل منفی، ۱-۴ گیاهان ترانسژن، wt گیاه شاهد غیر تراریخته، C⁺ پلاسמיד عنوان کنترل مثبت و M نشانگر ملکولی ۱ kb plus



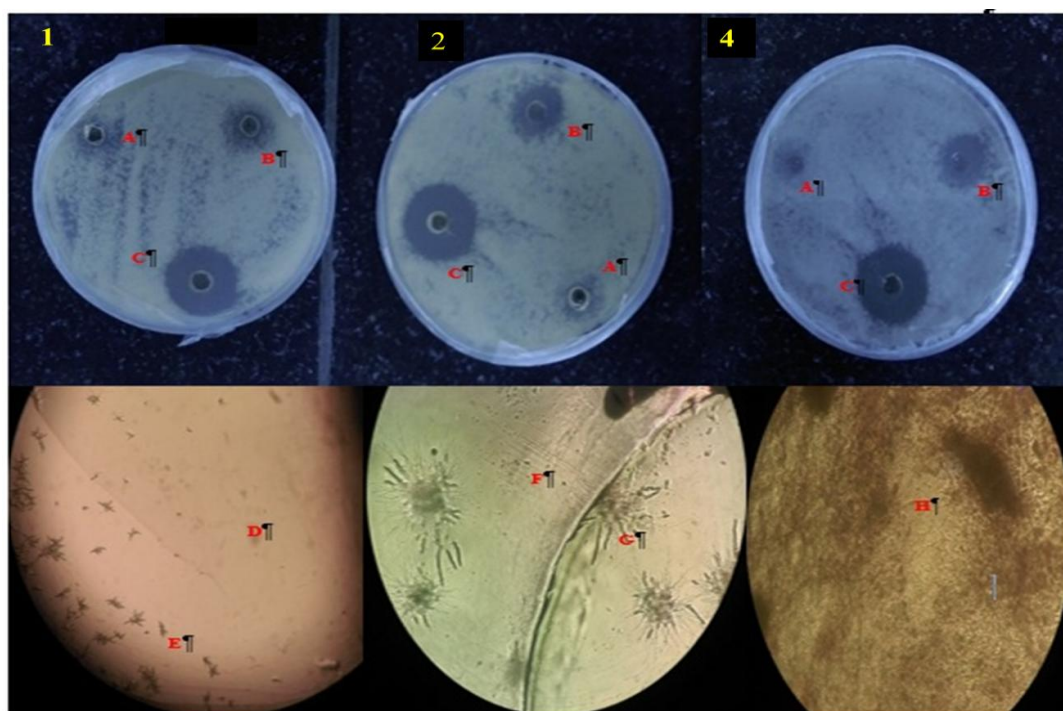
شکل ۴- مراحل رشد و باززایی گیاهان تراریخته، الف: گیاهیچه حاصل از مریستم در محیط انتخابی هفته هشتم د ب: گیاهیچه ریشه دار شده حاصل از مریستم هفته دهم ج: انتقال گیاهیچه حاصل از مریستم به گلدان هفته چهاردهم، د: انتقال گیاهان سازگار شده به گلدانهای بزرگتر، ه: گیاهان تراریخته در مراحل مختلف زایشی



شکل ۵- الکتروفورز ژل آگارز نتیجه واکنش PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *NaD1* بر روی cDNAهای سنتز شده. (M) نشانگر ملکولی ۱ kb plus، ۱-۵ گیاهان تراریخته، (WT) گیاه تیپ وحشی، C⁻ کنترل منفی واکنش PCR بدون cDNA، (P) کنترل مثبت که شامل پلاسמיד و گیاه تراریخته PCR⁺ است.

متفاوتی نسبت به جلوگیری از رشد قارچ عمل کردند، هر چه درجه غلظت عصاره پروتئینی گیاه افزایش یابد، رشد قارچ به میزان بیشتری کنترل می‌شد به طوری که چاهک حاوی غلظت خالص عصاره پروتئینی گیاه تراریخته در شعاع بیشتری (۱۴ میلی‌متر) از رشد قارچ ممانعت کرد هم‌چنین سایر گیاهان تراریخته درجات متفاوتی از مقاومت را نشان دادند جدول (۲).

آزمون زیست‌سنجی: به منظور ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخته به پاتوژن قارچی، روش کیفی زیست‌سنجی با استفاده از کنیدی قارچ (*Verticillium dahliae*) در چهار تکرار انجام شد. نتایج این آنالیز نشان داد که میزان رشد قارچ در چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی گیاهان تراریخته نسبت به یکدیگر و نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (شکل ۶). غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی گیاه به طور



شکل ۶- آزمون زیست‌سنجی جهت مطالعه تاثیر بیان ژن *NaD1* در گیاهان تراریخته بر روی رشد قارچ *Verticillium dahliae* A (۸۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته) B (۲۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۸۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته) و C (۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته): برای سه گیاه تراریخته ۱، ۲ و ۴ رقم خورشید، D: لبه چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه تراریخته شماره ۴، E: شعاع چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه تراریخته شماره ۴، F: لبه چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه غیر تراریخته. G: محیط PDA بدون عصاره پروتئینی گیاهی، H: چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه شاهد و یا (غیر تراریخته).

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت عصاره پروتئینی گیاهان تراریخته و شاهد در غلظت‌های متخف با استفاده عامل قارچ *V. dahliae*

تیمار	Inhibition zone of <i>V. dahliae</i> (mm)
۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته	2.4 a±13.8
۲۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۸۰ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته	3.6 b±10.2
۸۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۲۰ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته	1.6 c±5.2
۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج + ۰ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته	0 d±0.0
۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه شاهد (غیر تراریخته)	0 d±0.00

*توجه داشته باشید در هر ستون اعداد با حروف یکسان در سطح (۱٪) تفاوت معنی‌دار دارند.

ژن *NaD1* علاوه بر اینکه در کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی و فوزاریومی بسیار مؤثر است، می‌تواند در کنترل بسیاری از آفات زارعی هم مؤثر باشد، برای مثال این ژن می‌تواند در کنترل بال پولکداران (*Leptosphaeri amaculans*) و *F. graminearum* بسیار مؤثر باشد (Lay et al. 2012). انتقال ژن *NaD1* با منشا تنباکوی زینتی *Nicotiana glauca* به رقم کوکر سبب شد که گیاهان تراریخته حاصل در سطح مزرعه نسبت به ارقام مقاوم موجود ۲-۳ برابر بیشتر مقاومت نشان دهند هم‌چنین عملکرد الیاف در گیاهان تراریخته به میزان ۲-۴ برابر نسبت به گیاهان کنترل افزایش یابد (Gaspar et al. 2014) در این مطالعه پس از دریافت توالی ژن *NaD1* از پایگاه NCBI به منظور بهینه‌سازی بیان، بهینه‌سازی کدونی براساس کدون‌های ترجیحی پنبه زارعی انجام شد، به‌علاوه یک توالی ۲۸ نوکلئوتیدی عامل تقویت‌گر که در برگ‌گیرنده توالی کوزاک است (Joshi 1987) پیش از کدون شروع قرار داده شد، این ژن به‌صورت سنتتیک ساخته شد و تحت پیشبر 35S در سازه بیانی *pBI121* کلون شد و به‌واسطه اگروباکتريوم به ارقام تجاری پنبه منتقل شد. انتخاب گیاهان تراریخته در وهله اول براساس مقاومت به آنتی بیوتیک انتخابی، و سپس با استفاده از PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *NaD1* صورت گرفت. بررسی بیان با استفاده از واکنش RT-PCR انجام شد، که نتایج این بررسی نشان داد که میزان بیان در گیاهان تراریخته مختلف، متفاوت است که احتمالاً به دلیل موقعیت مکانی درج T-DNA می‌باشد. در این مطالعه از دو رقم برای تراریختی استفاده شد، هر چند که درصد باززایی و تراریخته‌گی هر دو رقم مشابه بود. اما رقم خورشید در مقایسه با رقم ورامین نسبت به شرایط سازگاری در گلخانه متحمل‌تر بود به‌علاوه گیاهان سازگار شده این رقم بذری بیشتری تولید کردند، هم‌چنین درصد گیاهان شیمیر در رقم خورشید بسیار کمتر از رقم ورامین بود، بنابراین آزمون‌های RT-PCR و زیست سنجی قارچ برای رویدادهای حاصل از زخم خورشید انجام شدند. آزمون زیست سنجی برای نمونه‌های مثبت RT-PCR حاکی از مقاومت بالای گیاهان تراریخته به پاتوژن قارچی ورتیسیلیوم می‌باشد. حین برهمکنش *NaD1* با هیف‌های *F. oxysporum* و *f. sp. vasinfectum* و

Verticillium dahliae سه رویداد کلیدی رخ می‌دهد: در ابتدا *NaD1* احتمالاً از طریق پروتئین‌های اختصاصی دیواره، به دیواره سلولی متصل می‌شود. سپس از طریق تغییر نفوذپذیری غشای پلاسمایی هیف، وارد سیتوپلاسم قارچ می‌شود، و در نهایت هنگامی که وارد سلول می‌شود، تولید گونه‌های اکسیژن آزاد و اکسید نیتروژن را القا نموده و در ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه افزایش سرعت مرگ سلولی مشارکت می‌کند (Hayes et al. 2013). پروتئین *NaD1* تحت شرایط فیزیولوژیکی تغییر شکل دایمری می‌دهد که این باعث افزایش فعالیت ضدقارچی آن احتمالاً از طریق افزایش سطح تماس با دیواره سلولی قارچ می‌شود (Lay et al. 2012). این پروتئین ضد قارچی یکی از معدود ژن‌هایی است که برخلاف سایر ژن‌های منتقل شده تاکنون، در شرایط مزرعه مقاومت نشان داده است، (Gaspar et al. 2018, Hayes et al. 2014). انتظار می‌رود نواحی تنظیمی بالادستی اضافه شده به ابتدای ژن میزان بیان مناسب‌تری ایجاد کند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اثر افزایشی عامل تقویت‌گر استفاده شده در این تحقیق در مراحل پس از رونویسی است، هم‌چنین این عامل تقویت‌گر بیان را در اندام ریشه با شدت بیشتری افزایش می‌دهد (Kanoria and Burma 2012). از آنجا که در توالی کوزاک نقش نوکلئوتیدهای شماره ۲- بالادست کدون شروع، مهم‌تر از سایر توکلئوتیدهای توالی بالادستی است و تحقیقات نشان داده که بهتر است این نوکلئوتیدها C یا G باشند (Bhullar et al. 2003) توالی عامل تقویت‌گر به کار رفته در این پژوهش توالی کوزاک با ویژگی‌های مطلوب را در برگرفته است. انتظار می‌رود گیاهان ترانسژن حاصل از انتقال این سازه بیان بالای ژن انتقالی را نشان دهند. هم‌چنین پیش‌بینی می‌شود که لاین تراریخته تولید شده علاوه بر مقاومت به بیماری‌های قارچی پژمردگی ورتیسیلیومی و فوزاریومی، نسبت به آفات بال پولک دار نیز مقاوم باشد. هم‌چنین ترکیب این ژن با دیگر ژن‌های ضدقارچی می‌تواند علاوه بر افزایش مقاومت به بیماری‌های قارچی پژمردگی ورتیسیلیومی و فوزاریومی، مقاومت به دامنه وسیع‌تری از بیماری‌های قارچی را فراهم کند.

سپاسگزاری

از گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بابت فراهم کردن هزینه‌های مربوط به ستر ژن تشکر می‌شود، همچنین از بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به‌خاطر فراهم آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Attílio LB, Fd AA, Mourão Filho R, Harakava TLd Silva LY, Miyata LCL, Stipp and BMJ Mendes (2013). "Genetic transformation of sweet oranges with the D4E1 gene driven by the AtPP2 promoter." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 741-747.

Bhullar S, S Chakravarthy, S Advani, S Datta, D Pental and PK Burma (2003). "Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants :cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping." *Plant Physiology* 132: 988-998.

Chan YL, V Prasad, KH Chen, PC Liu, MT Chan and CP Cheng (2005). "Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2. 1) drivenby fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack." *Planta* 221: 386-393.

Charity JA, P Hughes, MA Anderson, DJ Bittisnich, M Whitecross and T Higgins (2005). "Pest and disease protection conferred by expression of barley β -hordothionin and Nicotiana alata proteinase inhibitor genes in transgenic tobacco." *Functional Plant Biology* 32: 35-44.

Choi MS, S Heu, NC Paek, HJ Koh, JS Lee and CS Oh (2012). "Expression of hpa1 gene encoding a bacterial harpin protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* enhances disease resistance to both fungal and bacterial pathogens in rice and Arabidopsis." *The Plant Pathology Journal* 28: 364-372.

Dean R, JA Van Kan, ZA Pretorius, KE Hammond-Kosack, A Di Pietro, PD Spanu, JJ, Rudd, M Dickman, R Kahmann and J Ellis (2012). "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology." *Molecular plant pathology* 13: 414-430.

Eppl P, K Apel and H Bohlmann (1997). "Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*." *The Plant Cell* 9: 509-520.

مطالعات مربوط به انتقال و بررسی بیان ترانسژن برای نسل T1، با استفاده تکنیک PCR و تکنیک Kan-painting انجام شد (Ma et al. 2013). نتایج این بررسی نشان داد که هر چند انتقال ژن به ریزنمونه مریستم معمولاً مشکلات ایجاد شیم را در بردارد ولی در بسیاری از نتایج حاصل از گیاهان نسل T0، این ژن منتقل شده و بیان می‌شود. مطالعات مربوط به بررسی مقاومت در گیاهان به‌دست آمده در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نیز بایستی مورد بررسی قرار گیرد.

Esfahani K, M Motallebi, MR Zamani, H Hashemi Sohi and E Jourabchi (2010). "Transformation of Potato (*Solanum tuberosum* cv. Savalan) by Chitinase and β -1, 3-Glucanase Genes of Myco-Parasitic Fungi Towards Improving Resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3." *Iranian Journal of Biotechnology* 8: 73-81.

Fisher MC, DA Henk, CJ Briggs, JS Brownstein, LC Madoff, SL McCraw and SJ Gurr (2012). "Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health." *Nature* 484: 186.

Gao AG, SM Hakimi, CA Mittanck, Y Wu, BM Woerner, DM Stark, D. M. Shah, J. Liang and C. M. Rommens (2000). "Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide." *Nature biotechnology* 18: 1307.

Gaspar YM, JA McKenna, BS McGinness, J Hinch, S Poon, AA Connelly, MA Anderson and RL Heath (2014). "Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing the plant defensin *NaD1*." *Journal of experimental botany* 65: 1541-1550.

Geiser DM, T Aoki, CW Bacon, SE Baker, MK Bhattacharyya, ME Brandt, DW Brown, LW Burgess, S Chulze and JJ Coleman (2013). "One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use." *Phytopathology* 103: 400-408.

Hayes BM, MR Bleackley, MA Anderson and NL van der Weerden (2018). "The Plant Defensin *NaD1* Enters the Cytoplasm of *Candida albicans* via Endocytosis." *Journal of Fungi* 4: 20.

Hayes BM, MR Bleackley, JL Wiltshire, MA Anderson, A Traven and NL van der Weerden (2013). "Identification and mechanism of action of the plant defensin *NaD1* as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*." *Antimicrobial agents and chemotherapy: AAC*. 00365-00313.

Jach G, B Görnhardt, J Mundy, J Logemann, E Pinsdorf, R Leah, J Schell and C Maas (1995). "Enhanced quantitative

resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco." *The Plant Journal* 8: 97-109.

Juturu VN, GK Mekala and P. Kirti (2015). "Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium* spp.)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 120: 813-839.

Joshi CP (1987). "An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes." *Nucleic acids research* 15: 6643-6653.

Kamo K, D Lakshman, G Bauchan, K Rajasekaran, J Cary and J Jaynes (2015). "Expression of a synthetic antimicrobial peptide, D4E1, in *Gladiolus* plants for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 121: 459-467.

Kanoria S and PK Burma (2012). "A 28 nt long synthetic 5' UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants." *BMC biotechnology* 12: 85.

Kaur J, US Sagaram and D Shah (2012). "Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful fungal resistance in crop plants?" *Fungal Biology Reviews* 25: 128-135.

Klosterman SJ, ZK Atallah, GE Vallad and KV Subbarao (2009). "Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species." *Annual review of phytopathology* 47: 39-62.

Lay, F. and M. Anderson (2005). "Defensins-components of the innate immune system in plants." *Current Protein and Peptide Science* 6: 85-101.

Kharazian ZA, Jouzani GS, Aghdasi M, Khorvash M, Zamani M and Mohammadzadeh, H (2017). "Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi". *Biological control*, 110: pp.33-43.

Lay FT, F Brugliera and MA Anderson (2003). "Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia." *Plant physiology* 131: 1283-1293.

Lay FT, GD Mills, IK Poon, NP Cowieson, N Kirby, AA Baxter, NL van der Weerden, C Dogovski, MA Perugini and M. A. Anderson (2012). "Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity." *Journal of Biological Chemistry* 287: 19961-19972.

Lay FT, HJ Schirra, MJ Scanlon, MA Anderson and DJ Craik (2003). "The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP." *Journal of molecular biology* 325: 175-188.

Lin BB (2011). "Resilience in agriculture through crop diversification: adaptive management for environmental change." *BioScience* 61: 183-193.

Ma Z, J Liu and X Wang (2013). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) shoot apex with a fungal phytase gene improves phosphorus acquisition. *Transgenic Cotton*, Springer 211-222.

McKenna J, F Lay and M Anderson (2004). The potential of the antifungal protein NaD1 for control of *Fusarium*

wilt and *verticillium* wilt. Association Inc" Quality Cotton-A Living Industry" not just another yarn. 11th Australian Cotton Conference Proceedings, Gold Coast Convention and Exhibition Centre, Broadbeach Queensland.

Miao W, X Wang, M Li, C Song, Y Wang, D Hu and J Wang (2010). "Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpa Xoo* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism." *BMC Plant Biology* 10: 67.

Noman A, R Bashir, M Aqeel, S Anwer, W Iftikhar, M Zainab, S Zafar, S Khan, W Islam and M Adnan (2016). "Success of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Fiction or reality?" *Cogent Food and Agriculture* 2: 1207844.

Oard S and F Enright (2006). "Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi." *Plant cell reports* 25: 561-572.

Soni R and JA Murray (1994). "Isolation of intact DNA and RNA from plant tissues." *Analytical biochemistry* 218: 474-476.

Terras, F. R., K. Eggermont, V. Kovaleva, N. V. Raikhel, R. W. Osborn, A. Kester, S. B. Rees, S. Torreken, F. Van Leuven and J. Vanderleyden (1995). "Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense." *The Plant Cell* 7: 573-588.

Wang Y, C Liang, S Wu, X Zhang, J Tang, G Jian, G Jiao, F Li and C Chu (2016). "Significant improvement of cotton *Verticillium* wilt resistance by manipulating the expression of *gastrodia* antifungal proteins." *Molecular plant* 9: 1436-1439.

Wijayanto T, SJ Barker, SJ Wylie, DG Gilchrist and WA Cowling (2009). "Significant reduction of fungal disease symptoms in transgenic lupin (*Lupinus angustifolius*) expressing the anti-apoptotic baculovirus gene p35." *Plant biotechnology journal* 7: 778-790.

Wilson RA, RP Gibson, CF Quispe, JA Littlechild and NJ Talbot (2010). "An NADPH-dependent genetic switch regulates plant infection by the rice blast fungus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 21902-21907.

Wu Y, DJ Llewellyn and ES Dennis (2002). "A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues." *Plant molecular biology reporter* 20: 213-218.

Wu J, Luo X, Wang Z, Tian Y, Liang A and Sun, Y (2008). "Transgenic cotton expressing synthesized scorpion insect toxin AaHIT gene confers enhanced resistance to cotton bollworm (*Heliothis armigera*) larvae". *Biotechnology letters* 30: pp.547-554.

Yang Y, X Ling, T Chen, L Cai, T Liu, J Wang, X Fan, Y Ren, H Yuan and W Zhu (2015). "A cotton *Gbvdr5* gene encoding a leucine-rich-repeat receptor-like protein confers resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic *Arabidopsis* and upland cotton." *Plant molecular biology reporter* 33: 987-1001.

Yang Y, Chen T, Ling X and Ma Z (2018). "Gbvdr6, a gene encoding a receptor-like protein of cotton (*Gossypium*

barbadense), confers resistance to verticillium wilt in arabidopsis and upland cotton". *Frontiers in plant science*, 8: p.2272.

Zapata C, S Park, K El-Zik and R Smith (1999). "Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex." *TAG Theoretical and Applied Genetics* 98: 252-256.

Zhang B, Y Yang, T Chen, W Yu, T Liu, H Li, X Fan, Y Ren, D Shen and L Liu (2012). "Island cotton *Gbve1* gene encoding a receptor-like protein confers resistance to both defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*." *PloS one* 7: e51091.