ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۸
صفحه ۳۰۸ - ۲۹۷

انتقال ژن ضد قارچی *NaD1* برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی *Verticillium dahlia* و *Fusarium oxysporum* در پنبه (*Gossypium 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- به‌ترتیب 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 R[1], Marashi H[*1], Tohidfar M[2], Malekzadeh-shafaroudi S[1]

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 به‌وسیله 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 alata*، 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 اگروباکتریوم 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 dahlia* 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

اگروباکتریوم

پنبه

ژن *NaD1*

Fusarium oxysporum

Verticillium dahliae

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 2011). بیماری‌های قارچی ورتیسیلیوز (*Verticillium dahlia*) و پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum*) از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی پنبه می‌باشند که سالیانه خسارت زیادی وارد می‌کنند و تقریبا در تمامی اراضی تحت کشت پنبه مشاهده می‌شوند، این بیماری‌ها سبب کاهش ٤/٨٧ درصدی در تعداد غوزه، ٨/٣٨ درصدی در وزن غوزه و ٢/٩٢ 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 ٢٠٠ گونه گیاهی را هدف قرار می‌دهد. مؤثرترین روش در کنترل بیماری‌های فوزاریوم و ورتیسلیوز 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 وافزایش 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* آرابیدوپسیس (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* (Attílio et al. 2013)، بازدارنده‌های پروتئازی (Charity et al. 2005)، تیونین‌ها (Epple, 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 عصاره‌ی 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 معمولا 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 پروپپتید 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 alata*) است. این پروتئین متعلق به گروه دوم پروتئین‌های مقاومت است که متشکل از یک توالی سیگنال ٢٥ آمینواسیدی، دمین ٤٧ آمینواسیدی پروتئین بالغ مقاومت و یک CTPP چهل 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 شده‌است (Kaur et al. 2011). محققین با استفاده از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 ورتیسیلیومی سطح مقاومت اقتصادی نشان داده‌اند (Gaspar et al. 2014, Wang et al. 2016). در مطالعه حاضر ژن *NaD1* تحت پروموتور *35S* با استفاده *A. tumefaciens* به ارقام تجای 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 ورتیسیلیوز حساس هستند (Yang et al. 2018). به‌منظور ضدعفونی، 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 ٤٠ 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 ۲۰درصد و به مدت۲۰ 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)، ٤-۳ بذر قرار داده شد، سپس لوله‌ها در اتاق کشت با دمای (۲±۲۵ درجه) و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. جداسازی مریستم از گیاهچه‌های ۳-٤ روزه مطابق روش (1999) .Zapata et al 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 phytage) قرار داده شدند (۳-٤ ساعت).

باکتری و ناقل‌های مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری‌های *E. coli* سویه XILblue (Cinna Gen B16-50c) و اگروباکتریوم سویه LBA4404 (مقاوم به ریف آمپسین) استفاده شد. هم‌چنین از سازه‌های *pGH* دارای ژن سینتتک *NaD1* و (Clontech, Washangton, DC) *pBI121* دارای ژن *gus* و نشانگر انتخابی کانامایسین استفاده شد. آنزیم و محلول‌های مورد نیاز برای واکنش PCR از شرکت سیناژن و شرکت فرمتاز 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 Purfication انجام شد.

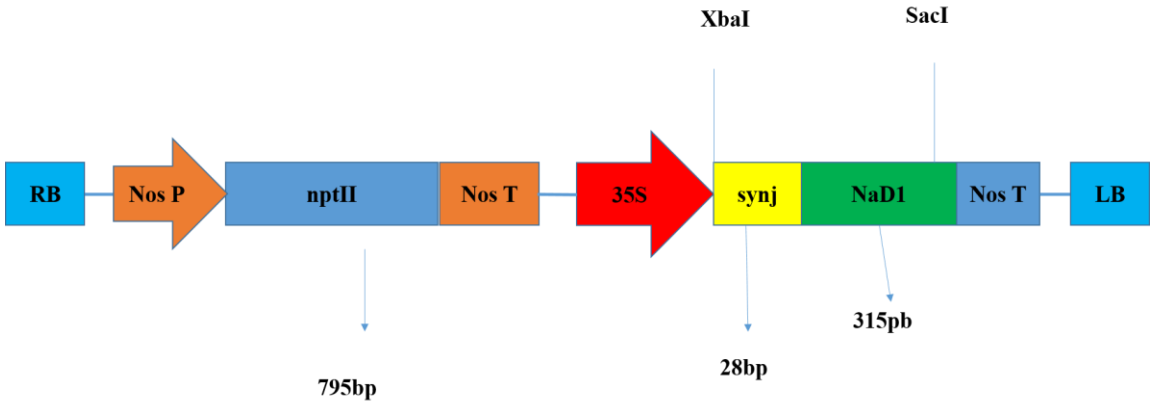
ساخت ژن *NaD1* و سازه ژنی: در ابتدا توالی ژن *NaD1* (GenBank accession number AF509566) از پایگاهNCBI دریافت شد. توالیcDNA آن انتخاب شد، در مرحله بعد با توجه به اینکه کدون‌های ترجیحی موجود هدف تاثیر مثبتی در افزایش بیان ژن دارند (Wu et al. 2008). با استفاده از نرم‌افزار (Thermo Fisher Scientific -US) vector NTi ™ 11 بهینه‌سازی کدونی انجام شد. قبل از کدون شروع یک توالی ۲۸ نوکلئوتیدی (شکل ۱، جدول ۱) به‌عنوان عامل تقویت‌گر[1] مطابق با بررسی‌های انجام شده اضافه شد (Joshi 1987, Kanoria and Burma 2012). هم‌چنین جایگاه‌های برشی آنزیم‌های (XbaI) و (وSacI) جهت همسانه‌سازی ژن درون ناقل (*pBI121*) Clontech, Washangton, (DC) به توالی مورد نظر اضافه شد. در نهایت توالی به‌صورت سینتتک توسط شرکت ندای فن ساخته شد. ژن *NaD1* به‌همراه توالی عامل تقویت‌گر اضافه شده به آن با استفاده از جایگاه‌های برشی XbaI وSacI 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 اگروباکتریوم سویه LBA 4404 (حاوی سازه مقاوم به آنتی بیوتیک ریف¬آمپسین75 mg/l) منتقل شد، سازه حاصل در سایر مراحل انتقال ژن مورد استفاده قرار

[1] Enhancer

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 آنتی¬بیوتیک‌های 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 ریف آمپسین کشت داده شد پس از ٤ ساعت باکتری رسوب داده شد و رسوب در محیط شامل MS مایع به اضافه ۷۵ میلی‌مولار MES به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین و دو درصد گلوکز و غلظت ۱۰۰ میکرولار استوسرینگون حل شد (PH محیط بر روی ٥/٤ 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 برروی کاغذ صافی خشک شدند و پس از خشک شدن به‌صورت عمودی و رو به بالا بر روی محیط هم‌کشتی (MS+ B5 Vit+ 1 mg/l BAP+ 3% Glocose+ 200mg/l aceto) که یک کاغذ صافی بر آن قرار داده شده بود منتقل شدند، و به مدت ٤٨ 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-BA,+90mg/l Kan + 2.5 g/l phytage) و هم‌چنین غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتاکسیم و ۲۰۰ میلی‌گرم کربنی‌سیلین (به‌منظور کنترل آلودگی آگروباکتریوم) در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه منتقل شدند. ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار واکشت[1] شدند.

[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، ptII 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	CTTCATGGCTTTCGCTATTCTTG	ACCAGTCTTAGTCATCTTTTCATCG	۲۲۱
Enhancer	ACACGCTGGAATTCTAGTATACTAAACC		۲۸

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ٦۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ثانیه و تکمیل بسط به مدت ۳ دقیقه) انجام شد، هم‌چنین از آغازگرهای ژن *Vir* برای تایید عدم آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شد.

استخراج RNA و واکنش RT-PCR: استخراج RNA از ٤ گیاه تراریخته تصادفی رقم خورشید و یک گیاه تیپ وحشی (گیاه غیر تراریخته، رقم خورشید) طبق پروتکل (Wu et al. 2002) و همراه با تیمارDNase انجام شد. سنجش کمّی و کیفی RNAهای استخراج شده، با استفاده از نسبت OD260/ OD280 تعیین شد، علاوه براین 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 ترانس‌کریپتاز معکوس در حضور آغازگرهای تصادفی dT و هم‌چنین آغازگر برگشتی[1] اختصاصی ژن *NaD1* انجام گرفت. cDNAی 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[2] به نام ۱٦srRNA 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.

روش kan-painting (آغشته کردن برگ با کانامایسین): در این روش به‌منظور 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 کاناماسین، 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 PDA[3]، ابتدا با استفاده از نوک سرتیپ استریل خراش‌هایی در سطح کشت ایجاد شد سپس به هر پتری‌دیش کشت قارچی یک میلی‌لیتر آب‌مقطر 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 آب‌مقطر کاملا 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 میکرولیترعصاره پروتئینی گیاه تراریخته) به درون چاهک‌ها اضافه شد، سپس درب پتری‌دیش‌ها

[1] reverse
[2] housekeeping
[3] Potato Dextrose Agar

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

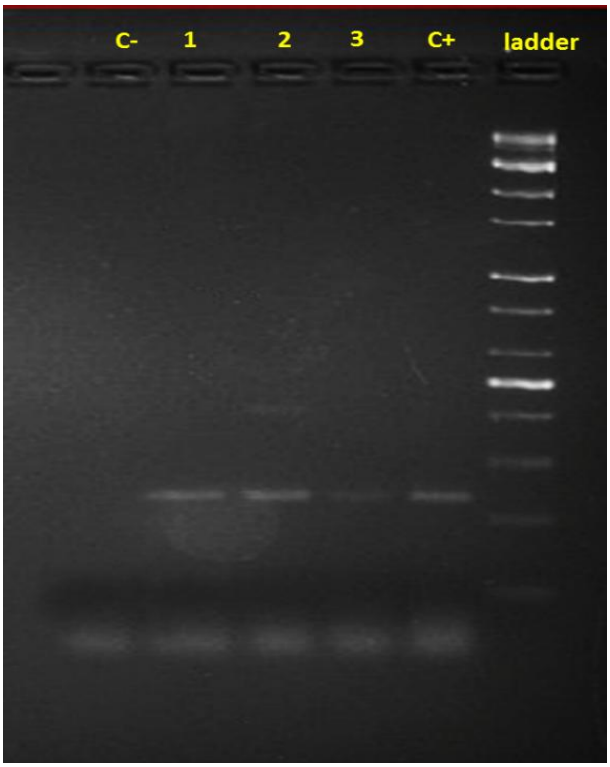
بسته و به مدت ۱۲۰ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (McKenna et al. 2004). در نهایت فعالیت آنتاگونیست عصاره گیاهی بر علیه قارچ *V. dahlia* با اندازه‌گیری قطر هاله ایجاد شده در اطراف هر چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت، شایان ذکر است که آزمایش برای هر رقت در چهار تکرار انجام شد (Kharazian et al. 2017).

تجزیه تحلیل آماری: کلیه‌ی آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شدند. تجزیه واریانس در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از SAS (نسخه ۹,۱)، و مقایسات میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($P<0.01$) انجام شد.

نتایج

پلاسمید نوترکیب *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 وSacI، 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 اگروباکتریوم منتقل و پس از تایید، جهت تراریخته‌گی ریزنمونه‌های مریستم استفاده شد. گیاهانی که پس 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 نمونه‌ها به اگروباکتریوم ازآغازگرهای*Vir* و آزمون PCR استفاده شد (شکل ۳). گیاهانی که برای PCR ژن *NaD1* مثبت و برایPCR ژن *Vir* منفی بودند به‌عنوان گیاهان تراریخته انتخاب شدند و به گلدان منتقل شدند (شکل ٤). از گیاهان رشد یافته پس از گلدهی بذرگیری به‌عمل آمد. در ادامه گیاهانT1 ترانسژن از طریق بررسی بیان کانامایسین با استفاده از روش kan-painting شناسایی شدند. پس از به‌کار 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.

به‌منظور 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 ٤[1] رقم خورشید بیان می‌شود. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش PCR رویcDNA گیاهان شاهد (غیر تراریخته) با همان شرایط، باندی نشان نداد. قابل ذکر است که جهت بررسی عدم آلودگیDNA، 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 نمونه‌های RNA آلودگی DNA ندارند (برای ژن *NaD1* هیچ باندی مشاهده نشد).

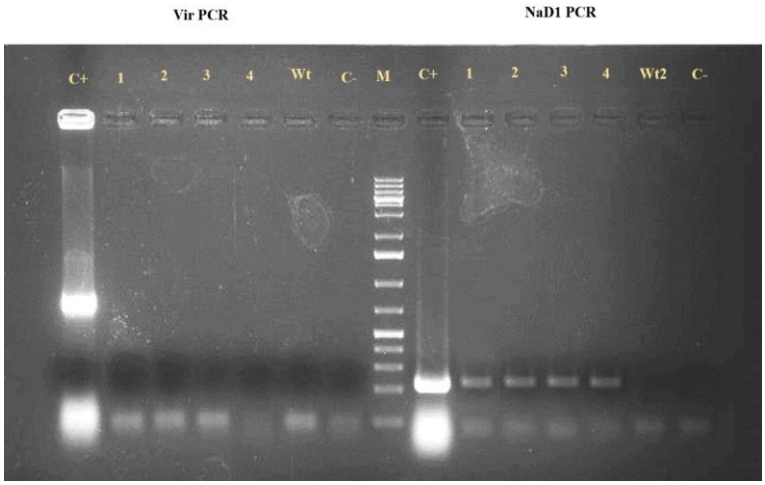


شکل ۲- نتایج حاصل از آنالیز کلونیPCR؛ C^-کنترل منفی،۱-۳ کلونی‌های مورد آزمایش، C^+ کنترل مثبت که شامل پلاسمید PGH می‌باشد، و Ladder نشانگر ملکولی ۱kb plus

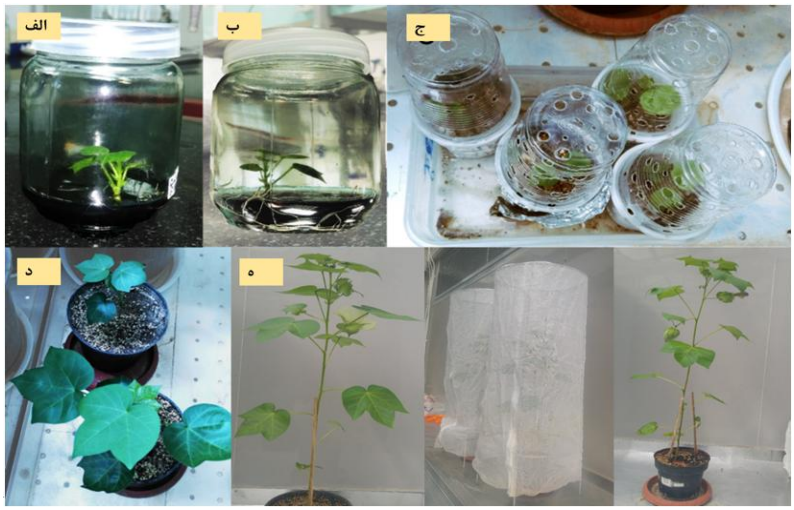
[1] Events number 4 and 2

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

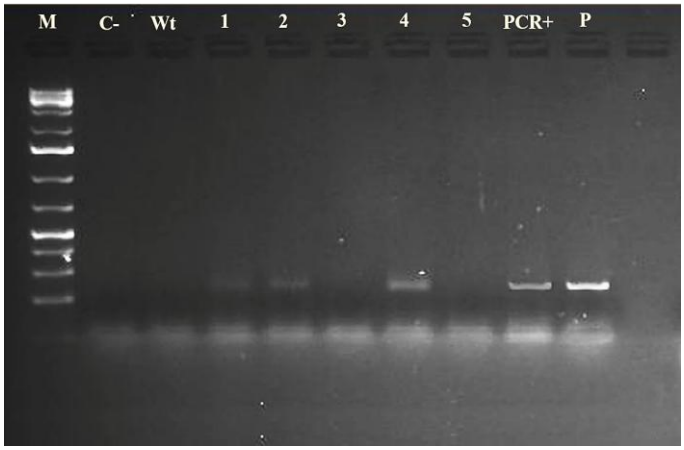
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]



شکل ۳- نتایج حاصل از آنالیز:PCR C^-کنترل منفی، ۱-٤ گیاهان ترانسژن، wt گیاه شاهد غیر تراریخته، C^+ پلاسمید عنوان کنترل مثبت و M نشانگر ملکولی ۱kb plus



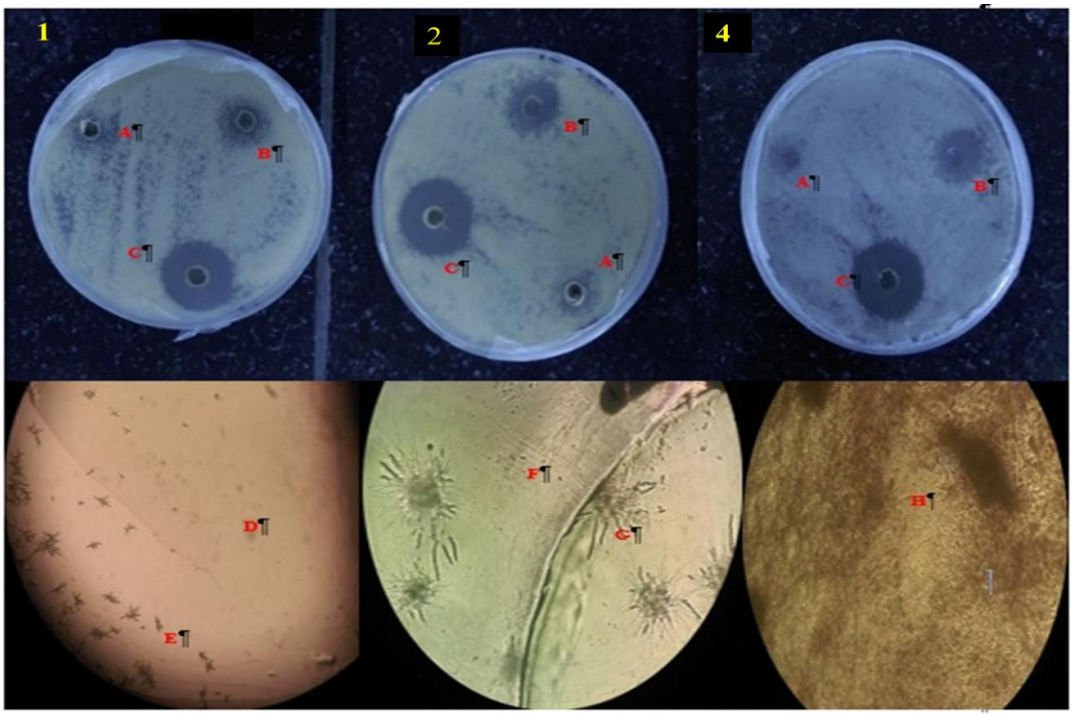
شکل ٤- مراحل رشد و باززایی گیاهان تراریخته، الف:گیاهچه حاصل از مریستم در محیط انتخابی هفته هشتم د ب: گیاهچه ریشه دار شده حاصل از مریستم هفته دهم ج: انتقال گیاهچه حاصل از مریستم به گلدان هفته چهاردهم، د: انتقال گیاهان سازگار شده به گلدان‌های بزرگ‌تر، ه: گیاهان تراریخته در مراحل مختلف زایشی



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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

آزمون زیست سنجی: به‌منظور ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخته به پاتوژن قارچی، روش کیفی زیست سنجی 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 نسب به یکدیگر و نسبت به گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (شکل ٦). غلظت‌های مختلف عصاره پروتئینی گیاه به‌طور 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 به‌طوری که چاهک حاوی غلظت خالص عصاره پروتئینی گیاه تراریخته در شعاع بیشتری (١٤ میلی‌متر) از رشد قارچ ممانعت کرد هم‌چنین سایر گیاهان تراریخته درجات متفاوتی از مقاومت را نشان دادند جدول (٢).



شکل ٦- آزمون زیست‌سنجی جهت مطالعه تاثیر بیان ژن *NaD1* در گیاهان تراریخته بر روی رشد قارچ *Verticillium dahlia*، A (٨٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ٢٠ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته) B (٢٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ٨٠ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته) و C (٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ١٠٠ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاه تراریخته): برای سه گیاه تراریخته ١، ٢ و ٤ رقم خورشید، D: لبه چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه تراریخته شماره ٤، E: شعاع چاهک حاوی عصاره پروتئینی گیاه تراریخته شماره ٤، 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 ٢- مقایسه میانگین فعالیت عصاره پروتئینی گیاهان تراریخته و شاهد در غلظت‌های متخف با استفاده عامل قارچ *V. dahliae*

Inhibition zone of V. dahlia (mm)	تیمار
2.4 a±13.8	٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ١٠٠ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته
3.6 b±10.2	٢٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ٨٠ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته
1.6 c±5.2	٨٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ٢٠ میکرولیتر عصاره گیاه تراریخته
0 d±0.0	١٠٠ میکرولیتر بافر استخراج+ ٠ میکرولیترعصاره گیاه تراریخته
0 d±0.00	١٠٠ میکرو¬لیتر عصاره گیاه شاهد (غیر تراریخته)

*توجه داشته باشید در هر ستون اعداد با حروف یکسان در سطح (١٪) تفاوت معنی‌دار دارند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

بحث

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 alata* 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 ۲-٤ 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 برگیرنده توالی کوزاک است (Joshi 1987) پیش از کدون شروع قرار داده شد، این ژن به‌صورت سنتیک ساخته شد و تحت پیشبر 35S در سازه بیانی *pBI121* کلون شد و به‌واسطه اگروباکتریوم 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 احتمالا به‌دلیل 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 وارمین نسبت به شرایط سازگاری در گلخانه متحمل‌تر بود به‌علاوه گیاهان سازگار شده این رقم بذر بیشتری تولید کردند، همچنین درصد گیاهان شیمر در رقم خورشید بسیار کمتر از رقم ورامین بود، بنابراین آزمون-های RT-PCR و زیست سنجی قارچ برای رویدادهای حاصل از زقم 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 احتمالا 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 احتمالا از طریق افزایش سطح تماس با دیواره‌ی سلولی قارچ می‌شود (Lay et al. 2012). این پروتئین ضد قارچی یکی ار معدود ژن‌هایی است که برخلاف سایر ژن¬های منتقل شده تاکنون، در شرایط مزرعه مقاومت نشان داده است، (Gaspar et al. 2014, Hayes et al. 2018). 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 معمولا مشکلات ایجاد شیمر را در بردارد ولی در بسیاری از نتاج 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.

سپاسگزاری

از گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بابت فراهم کردن هزینه‌های مربوط به سنتز 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.

Epple 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.

Esfahani K, M Motallebi, MR Zamani, H Hashemi Sohi and E Jourabchi (2010). "Transformation of Potato (Solanum tuberosumcv. Savalan) by Chitinase and Î²-1, 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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 translationstart 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 (2" .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 alata 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 agriculturethrough 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 improvesphosphorus 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, MLi, 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. Torrekens, 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]

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.

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.5.5]