کاربرد مهندسی ژنتیک در ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری‌ها

مهدی صدروی*

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۲۰ **تاریخ پذیرش**: ۱۳۹۱/۰۶/۲۹

صدروی، م. ۱۳۹۱. کاربرد مهندسی ژنتیک در ایجاد گیاهان مقاوم به بیماری‌ها. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱(۲): ۹-۱

چکیده

دانش مهندسی ژنتیک از حدود ۱۶۰ سال پیش با کشف قوانین وراثت صفات زیستی، آغاز گردیده و در آن روش‌های جداسازی و خالص‌سازی DNA از سلول، همانندسازی و تکثیر قطعه‌های آن با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، شناسایی و خالص نمودن ژن‌های مطلوب و انتقال آن‌ها به درون سلول گیاهان به طور غیر مستقیم با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* و یا به طور مستقیم با تفنگ ژنی و تولید گیاه کامل تراریخته از سلول تراریخته با کشت بافت، در طی ۴ دهه اخیر ابداع و کامل گردیده‌اند. با استفاده از این فنآوری امکان انتقال ژن‌های مطلوب، بدون همراهی با هیچ ژن نامطلوبی به گیاهان میسر شده است و گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی، نماتدها و تنش‌های محیطی تولید شده‌اند. مهندسی ژنتیک امیدی برای مدیریت بهتر بیماری‌های گیاهان و افزایش تولید محصولات کشاورزی برای تامین نیازهای غذایی جمعیت روزافزون انسان، به‌وجود آورده است.

واژه‌های کلیدی: بیماری، تراریخته، ژن، مقاوم، مهندسی

* پست الکترونیک : msadravi@yu.ac.ir

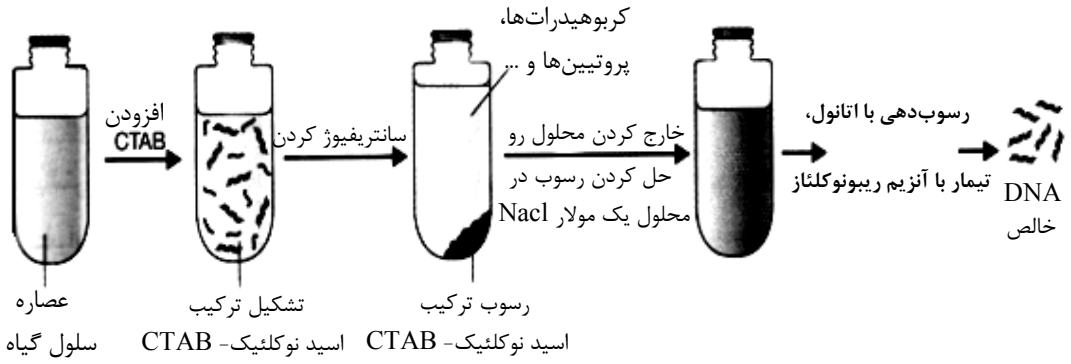
مقدمه

دانش مهندسی ژنتیک (Genetic engineering) در واقع با کشف قوانین وراثت صفات در حدود ۱۶۰ سال پیش و آشکار شدن این‌که هر صفت قابل توارث توسط عاملی به نام ژن (Gene) کنترل می‌شود، آغاز شد. در اوایل قرن بیستم میلادی مشخص شد که ژن‌ها روی کروموزوم‌ها (Chromosomes) و در هسته سلول قرار دارند. در سال ۱۹۵۲ ثابت شد که اسید دآکسی ریبونوکلئیک (Deoxyribonucleic acid = DNA) ماده اصلی ژنتیکی جانداران است و هر ژن در واقع توالی خاصی از این مولکول است. در طی ۱۴ سال یعنی بین سال‌های ۱۹۵۲ تا ۱۹۶۶ ساختار مارپیچ مضاعف این ماده و نحوه‌ی همانندسازی (Replication)، نسخه‌برداری (Transcription) و ترجمه (Translation) آن شناخته شدند. در خلال دهه ۱۹۸۰ روش برش دادن و تکثیر قطعات مولکول DNA و شناسایی ژن‌های مطلوب در شرایط آزمایشگاهی ابداع شد. سپس روش‌های انتقال ژن‌ها و تولید گیاهان تراریخته (Transgenic)، ابداع شدند. با استفاده از این فن‌آوری امکان انتقال ژن‌های مطلوب، بدون همراهی با هیچ ژن نامطلوبی، به گیاهان میسر شده است. اکنون سالیانه ده‌ها رقم گیاهان تراریخته که دارای ژن‌های مطلوب، از جمله مقاومت به بیماری‌ها، هستند، در کشورهای مختلف جهان، در طی مراحل زیر تولید و به کشاورزان عرضه می‌شوند (براون، ۲۰۱۰) .

۱- مراحل تولید گیاهان تراریخته

برای این هدف، ابتدا صفت مورد نظر در جاندار (ارقام مختلف همان گیاه، گیاهان دیگر، باکتری ، قارچ و یا سایر جانداران) با انجام آزمون‌های آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و یا مزرعه‌ای شناخته می‌شود. آن‌گاه در طی این مراحل ژن مسئول آن صفت در مولکول DNA جاندار شناسایی و خالص‌سازی می‌شود.

ابتدا برای جداسازی و خالص‌سازی مولکول DNA گیاه، دیواره سلولی آن با استفاده از آنزیم‌های مناسب (سلولاز، پکتیناز و..) شکسته می‌شود، سپس به عصاره سلولی ماده ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (Cetyl trimethylammonium bromide=CTAB)، که با اسیدهای نوکلئیک ترکیب غیرمحلولی ایجاد می‌کند، اضافه می‌شود. پس از سانتریفیوژ کردن ترکیب اسید نوکلئیک- CTAB رسوب می‌کند و کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و سایر مواد سلولی در مایع روی باقی می‌ماند. رسوب را در محلول ۱ مولار کلرید سدیم حل می‌کنند تا کمپلکس اسید نوکلئیک–CTAB شکسته شود. آن‌گاه DNA با رسوب‌دهی با اتانول تغلیظ شده و اسیدریبونوکلئیک (Ribonucleic acid = RNA) حذف می‌شود (شکل۱) .



شکل ۱- مراحل جداسازی و خالص‌سازی DNA گیاهان به روش CTAB (براون، ۲۰۱۰).

پس از جدا و خالص‌سازی DNA جاندار، با حضور آغازگرها (Primers)، آنزیم‌های لیگاز (Ligase) و DNA پلی‌مراز (DNA polymerase) و نوکلئوتیدها در طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction= PCR) قطعات مولکول DNA، در شرایط آزمایشگاهی، همانندسازی می‌گردند. محصول این واکنش زنجیره‌ای، که در دستگاه ترموسیکلر (Thermocycler) انجام می‌شود، چند میکروگرم (10^{-6}گرم) قطعه‌های کوتاه DNA، از چند نانوگرم (10^{-9} گرم) DNA اولیه است. پس از این که قطعه‌هایDNA جانداران اعم از گیاه حساس و مقاوم نسبت به یک بیماری، قارچ، باکتری و یا جانور دارای ژن مطلوب و جاندار فاقد آن ژن، به کمک این واکنش زنجیره‌ای تکثیر گردیدند، با الکتروفورز محصول این واکنش و مقایسه ژن‌های این جانداران، ژن مطلوب شناسایی و سپس جداسازی و خالص‌سازی می‌شود. ژن مطلوب یا به طور غیرمستقیم با استفاده از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942 و یا به طور مستقیم به روش بیولیستیک (Biolistic) یا زیست پرتابی با تفنگ ژنی به گیاه منتقل می‌شود. پس از انتقال ژن و اطمینان از تراریخته شدن سلول گیاه، آن را با قرار دادن روی محیط‌های کشت بافت که دارای نسبت‌های متفاوتی از هورمون‌های گیاهی هستند، به یک گیاه کامل تراریخته تبدیل می‌نمایند (براون، ۲۰۱۰).

۲- گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی

انتقال ژن کیتیناز باکتری *Serratia marcescense* Bizio 1823 ، به توتون، لوبیا و کانولا باعث مقاومت آن‌ها به مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kohn گردیده است (Brogli *et al.*,1991).

انتقال ژن کیتیناز به واریته Costle Rock گوجه‌فرنگی باعث افزایش مقاومت آن به پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* W. C. Snyder & H. N. Hansen گردید، به طوری که بوته‌های تراریخته تا ۶۰ درصد متحمل‌تر از بوته‌های غیرتراریخته شاهد بوده و نشانه‌های بیماری با تأخیر در آن‌ها ظاهر گردید (Dina *et al.*, 2008).

کانولای تراریخته حاوی ژن‌های آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل پراکسیداز باکتریایی در کلروپلاست، با استفاده از روش انتقال ژن توسط آگروباکتریوم تهیه شدند. مقاومت و سطح تحمل این گیاهان نسبت به دو بیمارگر اندام‌های هوایی به نام‌های *Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. (عامل سفیدک کرکی) و *Erysiphe polygoni* DC. (عامل سفیدک پودری)، در گلخانه و تحت شرایط حمله هر دو بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت. زیست سنجی بوته‌ها نشان داد که رشد و پیشرفت هر دو بیمارگر در برگ‌های بوته‌های تراریخته نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کمتر است و این رقم مقاومت بالایی نسبت به بیماری‌های سفیدک‌های کرکی و پودری یافته است. آنالیز شیمیایی این گیاهان نشان داد آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل پراکسیداز به طور چشم‌گیری در برگ‌های آن‌ها نسبت به شاهد بیشتر است (EL-Awady *et al.*, 2007).

ژن‌های بیان کننده ۲ آنزیم تخریب‌کننده دیواره سلولی به نام‌های اندوکیتیناز و اگزوکیتیناز در قارچ *Trichoderma atroviride* P. Karst. شناسایی شده و به صورت تک یا جفت به برنج منتقل گردیده‌اند. نتایج نشان دادند که ژن اندوکیتیناز باعث افزایش مقاومت گیاه برنج به بیماری سوختگی غلاف برگ می‌شود، در حالی که ژن اگزوکیتیناز در این مورد تأثیر کمتری دارد. با این وجود اگزوکیتیناز نسبت به اندوکتیناز، زمانی که ۲ ژن با هم منتقل شدند، تأثیر بهتری داشت. این ژن‌ها در ایجاد مقاومت به بیماری بلاست نیز موثر بودند (Mei *et al.*, 2004).

ارقام رُز تراریخته شده با ژن کیتیناز ۱۳ تا ۴۳٪ کمتر نشانه‌های بیماری لکه سیاه ناشی از قارچ *Diplocarpon rosae* F.A. Wolf نشان داده‌اند (Marchant *et al.*, 1998).

برگ‌های لاین‌های کلم بروکلی تراریخته که ژن اندوکیتیناز قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai را دریافت نموده‌اند، با هاگ‌های قارچ بیمارگر *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire تلقیح شدند، آن‌ها نشانه‌های بیماری را به طور معنی‌داری کمتر از شاهد نشان دادند و اندازه لکه‌های حاصل از بیمارگر با میزان فعالیت آنزیم اندوکیتیناز در آن‌ها همبستگی منفی داشت (Mora & Earle, 2001).

انتقال ژن یک آنزیم انسانی به ۲ رقم هویج Kurodagosun(K5) و Nahtes Scarlet (NS)، باعث مقاومت آن‌ها به قارچ‌های بیمارگر *Erysiphe heraclei* DC. (عامل سفیدک پودری) و *Alternaria dauci* (J.G. Kühn) J.W. Groves & Skolko (عامل سوختگی)، گردیده است (Takaichi & Oeda, 2000).

انتقال ژن مقاومت DRR ۲۰۶ از نخودفرنگی به کانولا باعث مقاومت آن به بیماری ساق سیاه ناشی از *Leptosphaeria maculans* (Fuckel) Ces. & De Not. شده است (Wang *et al.*, 1999).

۳- گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های باکتریایی

بیماری پژمردگی موز که به وسیله باکتری *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Yirgou & Bradbury 1968) Dye 1978 ایجاد می‌شود یک بیماری رایج در بسیاری از مناطق آفریقا است، که از ایران نیز گزارش شده است (امانی و همکاران، ۱۳۹۰)، باانتقال ژن Harp فلفل شیرین به لاین‌های Sukali Ndiiei و Mpologoma موز با استفاده از ناقل آگروباکتریوم آن‌ها به این بیماری مقاوم گردیدند (Tripathi *et al.*, 2010).

تراریخت کردن یک رقم برنج با ژن ap1 از فلفل شیرین که یک نوع پروتیین تولید می‌نماید باعث مقاومت آن به بیماری سوختگی باکتریایی ناشی از نژاد ۶ *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Ishiyama 1922) Swings, Van den Mooter, Vauterin, Hoste, Gillis, Mew & Kersters 1990 شده است (Tang *et al.*, 2001).

۴- گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های ویروسی

ویروس‌ها از بیمارگرهای مهم گیاهان هستند که باعث خسارت اقتصادی به محصول می‌گردند. در اوایل قرن بیستم میلادی تنها روش‌های قرنطینه، ریشه‌کنی و از بین بردن گیاهان بیمار، برقراری تناوب زراعی، استفاده از بافت گیاهی تکثیری سالم و شناسایی و یا تولید ارقام مقاوم از طریق اصلاح گیاهان برای مبارزه با این بیمارگرها شناخته شده بود، ولی در سال ۱۹۲۲ حفاظت توتون از آلودگی به ویروس موزاییک توتون (Tobacco mosaic virus=TMV) با مایه‌زنی آن با سویه خفیف همین ویروس گزارش شد. روشی که سپس به حفاظت تقاطعی (Cross protection) مشهور گردید و برای مبارزه با بیماری‌های ویروسی گوجه‌فرنگی، پاپایا و مرکبات نیز مورد استفاده قرار گرفت، ولی این روش پرهزینه بود و امکان این وجود داشت که ویروس خفیف مایه‌زنی شده به یک رقم گیاه برای رقم دیگر همان گیاه و یا برای سایر گیاهان تحت کشت در آن منطقه بیماری‌زا و خطرناک باشد. در سال ۱۹۸۵ با ابداع و تکمیل روش‌های انتقال ژن، ایده انتقال قسمتی از

ژنوم ویروس به گیاه ، به جای مایه‌زنی آن، مطرح شد و در سال ۱۹۸۶ توتون تراریخته با ژن کدکننده پوشش پروتیینی ویروس موزاییک توتون، که مقاومت بالایی در برابر آلودگی به بیماری نشان می‌داد وارد بازار شد. سپس کدوهای تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس‌های موزائیک خیار (Cucumber mosaic virus= CMV)، موزائیک کدو (Squash mosaic virus=SqMV) و موزائیک هندوانه (Watermelon mosaic virus=WMV) و پاپایاهای تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس لکه حلقوی پاپایا (Papaya ringspot virus= PRSV) ، سویای تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس موزائیک سویا (Soybean mosaic virus=SMV)، توتون تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس پیسک رگبرگ توتون (Tobacco vein mottling virus=TVMV)، طالبی تراریخت شده با ژن‌های پروتیین پوششی ویروس‌های موزاییک خیار ، موزائیک زرد کدو (Zucchini yellow mosaic virus= ZYMV) و موزائیک هندوانه ، سیب‌زمینی تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی (Potato leafroll virus= PLRV)، گوجه‌فرنگی تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس موزائیک خیار، کدو تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس موزائیک کدو، مرکبات تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس تریستیزای مرکبات (Citrus tristeza virus=CTV)، فلفل قرمز تراریخت شده با ژن‌های پروتیین پوششی ویروس‌های موزائیک خیار و موزائیک توتون و کانولای تراریخت شده با ژن پروتیین پوششی ویروس موزائیک شلغم (Turnip mosaic virus=TuMV)، که مقاومت معنی‌داری نسبت به بیماری ویروس مربوطه نشان می‌دهند، تولید شده‌اند (Scholthof *et al.*, 1993).

۵- گیاهان تراریخته مقاوم به نماتدها

توتون تراریخته با ژن ATNPR1 مقاومت معنی داری نسبت به نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood نشان داده، به طوری‌که در گیاه تراریخته وزن قسمت‌های هوایی و ریشه به میزان معنی‌داری بیشتر از گیاه غیرتراریخته و تعداد غده و توده تخم نماتد روی ریشه آن بسیار کمتر از گیاه غیر تراریخته بود (Priya *et al.*, 2011) .

دو رقم یونجه تراریخته شده با ژن‌های کدکننده oryzacystatin I و oryzacystatin II به دست آمده از برنج با نماتد مولد زخم ریشه *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev & Schuurmans Stekhoven مایه زنی شدند،

هر ۲ رقم مقاومت معنی‌داری نسبت به بیماری نشان دادند، به طوری که جمعیت نماتـد در اطـراف ریشـه ایـن ۲ رقـم بـه ترتیب ۲۹ و ۳۲٪ کمتر از شاهد بود (Samac & Smigocki, 2003)

۶- گیاهان تراریخته مقاوم به تنش‌های محیطی

تنش‌های محیطی نظیر خشکی، گرما یا سرمازدگی و شوری آب و خاک می‌توانند باعث خسارت اقتصادی به گیاهان و کاهش معنی‌دار، تا ۷۰٪، محصولات زراعی، باغی، سبزی و صیفی گردند. با شناسایی ژن‌های مقاومت بـه ایـن تـنش‌هـا و انتقال آن‌ها به گیاهان موفقیت‌های چشم‌گیری در این زمینه در طی ۳ دهه اخیر به‌دست آمده اسـت. بـه عنـوان مثـال بـا تولید برنج تراریخته با ژن کدکننده پروتیین گلوتامین‌اس‌ترانسفراز (Glutamine s-transferase) تحمل این گیـاه نسـبت به سرما افزایش یافته و سرعت جوانه‌زنی بذر آن در حالت غرقابی افزایش یافته و امکان تولید بیش از یک نوبـت آن در طـی سال با کشت مستقیم بذر در زمین اصلی فراهم گردیده است (Bajaj & Mohanty, 2005).

تراریخته نمودن چند لاین توتون با ژن کدکننده تری‌هالوز فسفات‌سینتاز (Trehalose phosphate synthase) از بـاکتری *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani & Chalmers 1919 ، بـه کمـک ناقـل *A. tumefaciens* ، باعث افزایش مقاومت آن‌ها به خشکی گردیده است، به طوری که وقتی آن‌ها تحت تنش خشکی قـرار گرفتند، در حالی که لاین غیر تراریخته کاملاً پژمرده گردید، لاین‌های تراریخته بین ۲۵ تا ۶۰٪ تحمل نسبت به این تـنش نشان دادند (Lee *et al.,* 2012).

۷- نتیجه

جمعیت جهان در سال ۸۰ میلیون نفر افزایش می‌یابد و سازمان خواربار جهانی پیش‌بینی کرده بـرای از بـین بـردن گرسنگی در جهان لازم است میزان تولید محصولات کشاورزی در طی ۲ دهه آینـده ۶۰٪ افـزایش یابـد. تولیـد و کاشـت گیاهان تراریخته یکی از روش‌های نوین و امیدبخش برای مدیریت بهینه بیماری‌های قارچی، ویروسی، باکتریـایی، نماتـدی، تنش‌های محیطی، آفات و علف‌های هرز است، تا تولید محصولات کشاورزی برای تامین نیازهای غذایی جمعیـت روزافـزون انسان، افزایش یابد و کشاورزی پایدار برقرار گردد (Park *et al.*, 2011).

منابع

امانی، م.، حسن‌زاده، ن. و رضائی، س. ۱۳۹۰. بیماری لکه برگی و نکروز باکتریایی موز. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱(۱): ۳۳-۲۷.

براون، ت. آ. ۲۰۱۰. کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA . ویرایش ششم. م. طباطبایی یزدی، غ. زرینی، ض. سپهری‌زاده، ع. قاسمیان و آ. همت (مترجمین). خانه زیست‌شناسی، ۱۳۹۰، ۴۳۹ ص.

سالاری، م. و امام‌جمعه، ع. ۱۳۸۵. فن‌آوری انتقال ژن در گیاه‌پزشکی. نشر بنفشه، ۱۳۰ ص.

Brogli, k., Chet, I., Holliday, M., Crossman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Manain, I. J. & Brogli, R. 1991. Transgenic plant with enhance resistance to fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.

Bajaj, S. & Mohanty, A. 2005. Recent advances in rice biotechnology: towards genetically superior transgenic rice . *Plant Biotechnology Journal* 3: 275–307.

Dina, E. A., Nagla A .A. & Magdy M. M. 2008. Production of transgenic tomato plant with enhanced resistance against the fugal pathogen *Fusarium oxysporum*. *Arab Journal of Biotechnology* 12(1): 45-62.

EL-Awady, M., Moghaieb, R. & EL- Sharkawy, M. 2007. Transgenic canola plant over-expressing bacteial catalase exhibit enhanced resistance to *Peronospora parasitica* and *Erysiphe polygoni*. *Arab Journal of Biotechnology* 11(2): 75-88.

Lee, D. H. , Ryu, H., Bae, H. H. & Kang, S. G. 2012. Transgenic tobacco plants harboring the trehalose phosphate synthase TPS gene of *Escherichia coli* increased tolerance to drought stress. *Research Journal of Biotechnology* 7(2): 22-26.

Marchant, R., Davey, M. R., Lucas, J. A., Lamb, C. J., Dixon, R. A. & Power, J. B. 1998. Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding* 4(3):187-194.

Mei, L., Zong-xiu, S., Jie, X., Tong, X. 2004. Enhancing rice resistance to fungal pathogen by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderrma atroviride*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 5(2): 133-136.

Mora, A. A. & Earle, E. D. 2001. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Molecular Breeding* 8(1): 1-9.

Park, J. R., McFarlane, I., Phipps, R. H. & Ceddia, G. 2011. The role of transgenic crops in sustainable development. *Plant Biotechnology Journal* 9:2–21.

Priya, D. B., Somasekhar, N., Prasad, J. S. & Kirti, P. B. 2011. Transgenic tobacco plants constitutively expressing *Arabidopsis* NPR1 show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* . *BMC Research Notes* 4 :231

Samac, D. A. & Smigocki, A. C. 2003. Expression of oryzacystatin I and II in alfalfa increases resistance to the root-lesion nematode. *Phytopathology* 93:799-804.

Scholthof, K-B. C., Scholthof, H.B. & Jackson, A.O. 1993. Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiology* 102:7-12

Takaichi, M. & Oeda, K. 2000. Transgenic carrot with enhanced resistance against two major pathogen, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*. *Plant Science* 153(2): 135-144.

Tang,K., Sun,X., Hu,Q., Wu,A., Lin,C-H., Lin, H-J., Twyman, R.M., Christou, P. & Feng, T. 2001. Transgenic rice plants expressing the ferredoxin-like protein (AP1) from sweet pepper show enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Science* 160: 1035-1042.

Tripathi, L. Mwaka, H., Tripathi, J. N. & Tushemereirwe, W. K. 2010. Expression of sweet pepper Hrap gene in banana enhance resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Molecular Plant Pathology* 11(6): 721-731.

Wang , Y. , Nowak , G., Culley , D. , Hadwiger , L. A. & Fristensky, B. 1999. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(5): 410-418.