

Identification and expression analysis of genes involved in the ETI defense pathway in saffron corms infected with corm rot disease (*Fusarium oxysporum*)

Nasrin Hematpour¹, Farhad Nazarian-Firouzabadi²(ORCID: 0000000282913887), Seyed Sajad Sohrabi³, Mitra Khademi³

1. Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Assistant Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Correspondence:

Farhad Nazarian-Firouzabadi

Email: nazarian.f@lu.ac.ir

Received: 09, Aug. 2024

Accepted: 06, Jan. 2025

How to cite:

Hematpour, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S., & Khademi, M. (2025). Identification and expression analysis of genes involved in the ETI defense pathway in saffron corms infected with corm rot disease (*Fusarium oxysporum*). *Crop Biotechnology*, 14 (2), 53-66. (DOI: [10.30473/cb.2025.72010.1981](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72010.1981))

ABSTRACT

Saffron (*Crocus sativus* L.), a perennial plant of the Iridaceae family, is predominantly cultivated in Iran. Despite its high economic value both domestically and globally as a precious spice, its cultivation faces substantial challenges from numerous pathogens which significantly impact both yield and quality. Resistance genes (R-genes) encode R-proteins that play a crucial role in activating plant defense mechanisms against pathogens. Nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes are a family of intracellular R-genes that confer resistance to plants by initiating Effector-Triggered Immunity (ETI). In this study, an in silico study was conducted on the transcriptome of saffron corms infected with *Fusarium oxysporum* to identify NBS-LRR genes at 48 and 72 hours after inoculation using bioinformatics software and databases. Arabidopsis NBS-LRR gene sequences were used to identify NBS-LRR members in the saffron corm transcriptome. Then, the expression profile of NBS-LRR candidate genes was studied. Based on the results of BLASTX algorithms, 63326 transcripts were documented. The results of this study revealed the presence of 30 NBS-LRR gene transcripts in the transcriptome of saffron corms. The expression of the selected genes was significantly up-regulated in infected corms compared to healthy control corms. Furthermore, analysis of the selected NBS-LRR genes indicated that their expression levels were higher at 72 hours after inoculation compared to 48 hours. The LRR1 gene had a higher expression level than the LRR2 gene at 48 and 72-hours post-inoculation. Plus, the results of this study revealed that NBS-LRR genes are expressed in almost all saffron tissues, suggesting their involvement in the saffron's response to fungal infections. The findings of this study suggest that NBS-LRR genes hold significant potential for utilization in future saffron breeding programs.

KEYWORDS

Bioinformatics, *Fusarium oxysporum*, Gene expression, NBS-LRR gene.



مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.)، گیاهی چندساله و از خانواده زنبقیان (Iridaceae) است که اغلب در مناطقی با اقلیم خشک کشت می‌شود (Shah et al., 2017). در صنایع غذایی از کلاله زعفران با رنگ قرمز و یا نارنجی به عنوان عامل طعم‌دهنده و رنگ دهنده طبیعی مواد غذایی استفاده می‌شود (Golmohammadi, 2014). به‌علاوه، زعفران به عنوان یکی از داروهای موثر در طب گیاهی و سنتی شناخته می‌شود که اثرات دارویی آن عمدتاً مربوط به متابولیت‌های اصلی این گیاه همانند؛ کروکوسین، پیکروکروسین^۱ و سافرانال^۳ است (Golmohammadi, 2014). ایران با ۱۲۰ هزار هکتار سطح زیر کشت و ۴۳۹ تن تولید سالانه پیشرو در تولید زعفران جهان است (Saeedi et al., 1400). در حال حاضر تنها ۲۰ درصد محصول زعفران به مصرف داخل کشور می‌رسد و بقیه تولید به سایر کشورهای جهان صادر می‌شود؛ از این رو، ایران به‌عنوان بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده زعفران در جهان، شناخته می‌شود. باوجود ارزش اقتصادی و دارویی، زعفران به دلیل تریپلوئید بودن ($2n=3x=24$) عقیم است و قادر به تولید بذر نیست به همین دلیل از طریق بیه کشت و تکثیر می‌شود (Golmohammadi, 2014).

بیمارگرهای گیاهی جزء مهم‌ترین عواملی هستند که تولید زعفران را تهدید می‌کنند و در بین این عوامل، قارچ‌ها از اهمیت زیادی برخوردارند (Khaledi, 2020). بیماری قارچی پوسیدگی بیه (*Fusarium oxysporum*) از مهم‌ترین بیماری‌های زعفران است که نه تنها موجب کاهش عملکرد می‌شود، بلکه بر کیفیت و کمیت بیه‌های دختری تاثیر می‌گذارد (Khaledi, 2020). یکی از راهکارهای مهم برای کنترل بیماری‌ها و کاهش خسارت ناشی از آن‌ها، تولید و استفاده از ارقام مقاوم به بیماری است (Ahmad et al., 2022). لازمه چنین عملی، شناسایی و جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری، جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های بهنژادی است. گیاهان از

ساز و کارهای دفاعی کارآمدی برای مقابله با حمله بیمارگرهای مختلف موجود در زیستگاه خود استفاده می‌کنند (Dangl and Jones, 2001; Van Der Biezen and Jones, 1998). علاوه بر موانع دائمی، گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی دیگری موسوم به سیستم‌های ایمنی ذاتی (innate immunity) هستند (Fallahzadeh, 2018; Jacob et al., 2013) که در آن سلول‌های گیاهی مورد حمله بیمارگر، وجود بیمارگرها را حس کرده و بلافاصله واکنش‌هایی از خود نشان می‌دهند که از گسترش بیماری جلوگیری می‌کنند (Fallahzadeh, 2018).

گیرنده‌های ایمنی ذاتی گیاهی شامل گیرنده‌های تشخیص سطحی (PRRs) (Pattern Recognition Receptors) و همچنین گیرنده‌های درون سلولی (NLR Receptors) (Intracellular-Lular NLR Receptors) است (Chiang and Coaker, 2015). گیرنده‌های PRR می‌توانند الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب یا بیمارگر^۴ (M/PAMPs)، الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب^۵ (DAMPs) و پروتئین‌های مؤثر خارج سلولی را شناسایی کنند (Lolle et al., 2020). الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگرها (PAMP) گروهی از بیمارگرها را برای گیاه شناسایی می‌کنند. به ایمنی که بعد از شناسایی PAMPها ایجاد می‌شود به اصطلاح ایمنی ناشی از PAMP^۶ (Chisholm et al., 2006) و ایمنی تحریک شده با الگو را PTI^۷ می‌گویند (Jacob et al., 2013). ایمنی ناشی از افکتور^۸ (ETI) به‌صورت عمومی منجر به پاسخ فوق حساسیت و مرگ سلولی بافت اطراف محل آلودگی می‌شود و بنابراین بیمارگر را به محل آلودگی محدود می‌کند (Fallahzadeh, 2018; Jacob et al., 2013). اکثر پروتئین‌های رمز شده توسط ژن‌های مقاومت دارای محل اتصال نوکلئوتیدی (= Nucleotide Binding Site) (NBS) و دمین‌های غنی از اسید آمینه لوسین (-Leucien)

4Microbe-Associated or Pathogen-Associated Molecular Patterns (M/PAMPs)

5Damage-Associated Molecular Patterns

6PAMP-Triggered Immunity-PTI

7Pattern-Triggered Immunity

8Effector-Triggered Immunity

1Crocic

2Picrocrocic

3Safranal

مواد و روش‌ها

تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

جمع‌آوری و پردازش داده‌های خام

علاوه بر داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت بنه زعفران تحت تیمار قارچ عامل پوسیدگی بنه (Darvishian *et al.*, 2022)، به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده، داده‌های بیانی حاصل از توالی‌یابی RNA از بافت‌های مختلف زعفران شامل بنه، برگ، گل‌برگ، پرچم و کلاله، جوانه اپیکال، جانبی و انتهایی، از پایگاه داده SRA دریافت شدند. به منظور بررسی کیفیت داده‌های خام از نرم افزار FastQC (Version 0.11.6) استفاده شد. برای انجام فرآیند ترمینگ (شامل حذف توالی آداپتور باقی‌مانده در توالی‌های موجود، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phredscore کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌هایی با اندازه کمتر از ۱۰۰ جفت باز) از نرم‌افزار CLC GenomicsWorkbench (نسخه ۲۰) استفاده شد. سرهم‌بندی (اسمبلی) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench بر اساس شاخصه‌های پیش فرض انجام شد.

شناسایی اعضای خانواده ژنی NBS-LRR

به منظور شناسایی اعضای خانواده NBS-LRR در زعفران، ابتدا توالی‌های خانواده ژنی NBS-LRR آرکیدوپسیس از پایگاه داده TAIR (https://www.arabidopsis.org) دریافت شدند. سپس جهت شناسایی توالی‌های شامل دمین NBS-LRR در زعفران، توالی‌های دریافت شده علیه داده‌های ترنسکرپتوم زعفران (حاصل از سرهم‌بندی نوپدید داده‌های بیانی موجود زعفران در پایگاه داده SRA)، با استفاده از ابزار بلاست نرم‌افزار TBtools مورد جستجو قرار گرفتند. توالی‌های پروتئینی شناسایی شده براساس دمین LRR با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W هم‌ردیف شدند. علاوه بر این، برای اطمینان از صحت توالی‌های شناسایی شده، تمام ORF‌ها برای وجود دمین‌های پروتئینی

(Rich Repeats=LRR) با طول متغیر در انتهای کربوکسیل هستند. این دمین‌ها در برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و ترانس‌سانی پیام‌های مولکولی شرکت می‌کنند. ژن‌های مقاومت گروه NBS-LRR متداول‌ترین گروه ژن‌های مقاومت هستند. خانواده پروتئینی NBS-LRR در گیاهان را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. گروه اول قسمت انتهایی N گیرنده‌های اینترلوکین-۱ (TIR) را کد می‌کند که NBS-LRR یا TNL نامیده می‌شوند (Zhou *et al.*, 2004). گروه دوم قسمت TIR را رمزگذاری نمی‌کنند و NBS-LRR یا CC یا CNL نامیده می‌شوند که حاصل آن‌ها معمولاً دمین‌های ماریپیچ-ماریپیچ در ناحیه N ترمینال می‌باشد (Zhou *et al.*, 2004). در واقع این پروتئین‌ها، محرک‌های وابسته به ژن‌های Avr تولید شده توسط بیمارگرها را به طور مستقیم و غیرمستقیم تشخیص می‌دهند (Keen, 1990).

هنگامی که یک گیرنده‌ی گیاهی LRR به محرک بیماری‌زای متصل می‌شود، پروتئین TNL و CNL دچار یک تغییر ساختاری شده و با سایر پروتئین‌ها موجود در مسیر پاسخ‌های دفاعی واکنش می‌دهد و منجر به مرگ سلول گیاهی آلوده می‌شود، بنابراین از گسترش بیشتر بیمارگر جلوگیری می‌کند. تاکنون صدها ژن NBS-LRR، در ژنوم گیاهان مختلف همچون ذرت، سیب، سیب‌زمینی شیرین، آرکیدوپسیس و نخود به دلیل نقش اساسی آن‌ها در ایمنی گیاهی و فراوانی آن‌ها در ژنوم گیاهان شناسایی شده است. تعریف مجموعه کاملی از پروتئین‌های NBS-LRR در ژنوم گیاه، بینش‌هایی را در مورد تنوع ژن‌های دفاعی موجود در گیاه ارائه می‌دهد (Dangl and Jones, 2001; Van Der Biezen and Jones, 1998). از این رو هدف پژوهش حاضر شناسایی ژن‌های NBS-LRR در گیاه زعفران به منظور تعیین دخالت یا عدم دخالت آن‌ها در مقاومت این گیاه به بیماری فوزاریوم و بررسی بیوانفورماتیکی خانواده ژنی NBS-LRR در ترنسکرپتوم بنه‌های زعفران آلوده به بیماری *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli* می‌باشد.

مایه‌زنی بنه‌های زعفران با قارچ فوزاریوم
 قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli* از مطالعات پیشین درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) تهیه گردید (Darvishian et al., 2022). از جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بنه‌ها استفاده شد. برای انجام تیمار قارچی بر روی هر یک از بنه‌های زعفران منافذی ایجاد شد و با سرنگ میزان ۵ میکرو لیتر از محلول سوسپانسیون قارچ به بنه‌ها تزریق گردید. برای تیمار شاهد به جای تزریق سوسپانسیون قارچ، از آب مقطر استریل استفاده شد. در هر شیشه مربا، تعداد سه بنه تیمار شده یا شاهد قرار داده شد. سپس بنه‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان‌های تیمار، برای اطمینان از آلودگی توسط قارچ فوزاریوم، کشت مجدد از قارچ انجام شد به این صورت که مجدداً در محیط کشت PDA واکشت قارچ انجام شد و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. وضعیت رشد قارچ توسط متخصص بیماری‌شناس با روش چشمی و میکروسکوپی بررسی و صحت آزمایش تایید شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت بررسی بیان ژن‌های کاندید خانواده‌های ژنی NBS-LRR از بنه‌های زعفران تحت تیمار قارچ و بنه‌های شاهد (بدون مایه‌زنی با قارچ)، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از کیت ترایزول (شرکت NEB به شماره T2010S) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز RNA روی ژل آگارز ۱ درصد و کمیت سنجی غلظت RNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها از تیمار با آنزیم DNase I استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت

LRR، NBS، TIR یا R با استفاده از پایگاه CDD مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. علاوه بر این، توالی پروتئینی ژن‌های شناسایی شده بر اساس آنالیز موتیف Pfam طبقه بندی شدند.

بررسی بیان اعضای خانواده ژنی NBS-LRR

پس از نقشه‌یابی خوانش‌های تمیز شده علیه مرجع ترنسکریپتومی ساخته شده، مقادیر بیان ژن‌های شناسایی شده در مقیاس رونوشت در هر میلیون (TPM) در هر بافت-تیمار محاسبه شد. پس از کمی‌سازی بیان ژن‌ها، توالی‌های با مقادیر $\log_{2}FC$ بزرگ‌تر مساوی $1 \pm$ و FDR کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شدند. در نهایت به منظور گروه‌بندی ژن‌ها در تیمارهای مورد مطالعه، از تحلیل خوشه‌ای به‌همراه ترسیم نقشه حرارتی مبتنی بر مقادیر $\log(TPM+1)$ استفاده شد.

مایه‌زنی بنه‌های زعفران و بررسی بیان ژن‌های کاندید

تهیه و ضدعفونی بنه‌های زعفران

بنه‌های زعفران زراعی (*Crocus sativus L.*) مورد استفاده در این مطالعه از مزارع کشت زعفران در مشهد برداشت و پس از ارزیابی سلامت بنه‌ها تحت نظر متخصص بیماری‌های گیاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان منتقل شدند. برای انجام آزمایش‌ها، ابتدا بنه‌ها ضدعفونی شدند. به این ترتیب که بنه‌ها یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس چندین مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس بنه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و بار دیگر برای زدودن باقیمانده‌ی مواد ضدعفونی کننده، سه بار با آب مقطر هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند.

شد. برای انجام این واکنش از کیت سایبرگرین SinaSYBR Blue IIS-qPCR Mix, 2x شرکت سیناکلون استفاده شد. هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر (2x) Master Mix، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود و واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش PCR کمی در جدول ۲ نشان داده شده است. در این آزمایش از ژن کنترل داخلی *elf1-α* جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). هر نمونه در سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار LinRegPCR و Microsoft Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد.

سنتز cDNA شرکت سینا کلون استفاده شد و سنتز مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت.

طراحی آغازگر

پس از انتخاب توالی ژن‌های مورد نظر (براساس بیشترین میزان بیان) طراحی آغازگرها جهت استفاده در واکنش qRT-PCR، با استفاده از نرم افزار AlleleID انجام شد. برای اطمینان بیشتر از صحت این آغازگرهای طراحی شده از ابزار برخط Primer blast استفاده شد (جدول ۱).

بررسی الگوی بیان ژن‌های LRR با روش Real-time RT-PCR

جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) استفاده

جدول ۱. فهرست آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های NBS-LRR انتخاب شده و ژن کنترل داخلی

Table 1. List of primers designed for NBS-LRR genes and reference gene

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر (۵'→۳')	دمای اتصال (°C) Tm (°C)
LRR-1	F: ATGACGATACTGAATCTC R: GTTAATGGTTGGATGTG	54
LRR-2	F: ACTTGTAATTGCGTTGGATGTG R: TCGGATACCTTGGCTCTCAG	55
Elongation factor 1α (<i>elf1-α</i>)	F: TGAACCATCCAGGACAGATTG R: TCTTAACCATAACCAGCATCACC	57

جدول ۲. سیکل دمایی واکنش PCR برای ژن‌های NBS-LRR انتخاب شده

Table 2. Temperature cycle of the PCR reaction for selected NBS-LRR genes

تعداد چرخه Number of cycles	زمان Time	دما (°C) Temperature (°C)	مرحله واکنش Step
1	5 min	95	واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation
35	15 s	95	واسرشت‌سازی Denaturation
35	20 s	-	اتصال آغازگرها Annealing
35	30 s	72	بسط Extension
1	5 min	72	بسط نهایی Final Extension

نتایج و بحث

سرم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم زعفران

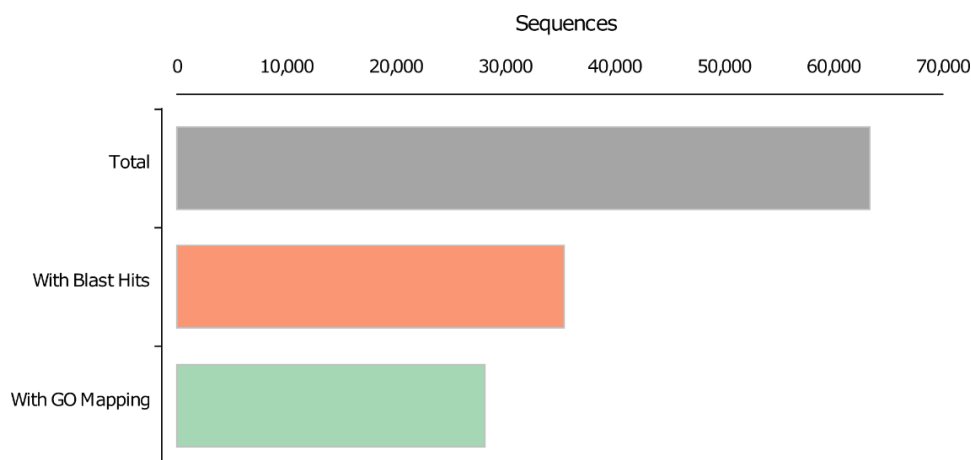
سرم‌بندی پروفایل بیانی زعفران با استفاده از ادغام خوانش‌های تریم شده (Trimmed reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰)، منجر به ایجاد ۶۳۳۲۶ توالی منحصر به فرد شد. همچنین حجم کل پروفایل بیانی زعفران ۶۴/۶۵ Mb محاسبه شد. پروفایل بیانی ایجادشده از نظر حجم و تعداد رونوشت مطابقت بالایی با دیگر پروفایل‌های بیانی گزارش شده زعفران داشت (جدول ۳) (Hu et al., 2020).

نتایج بلاست اسمبلی ساخته‌شده علیه پایگاه NR نشان داد که تعداد ۳۵۳۹۴ (۵۵/۸۹ درصد) رونوشت با حد آستانه $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$ دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند (شکل ۱). همچنین نتایج بلاست اسمبلی در مطالعه حاضر نشان داد که ترنسکرپتوم زعفران بیشترین شباهت را با ترنسکرپتوم مارچوبه (*Asparagus officinalis*) و پس از آن با نخل (*Phoenix dactylifera*) داشت (شکل ۲). با توجه به فقدان توالی‌های ژنی ثبت شده در پایگاه داده NCBI برای گیاه زعفران، مستندسازی و تعیین گروه‌های کارکردی رونوشت‌های حاصله، تولید محتوا و افزایش اطلاعات ژنتیکی این گیاه ارزشمند خواهد بود.

جدول ۳. خلاصه‌ای از کمیت و کیفیت داده‌های خوانش شده مرجع ترنسکرپتومی زعفران

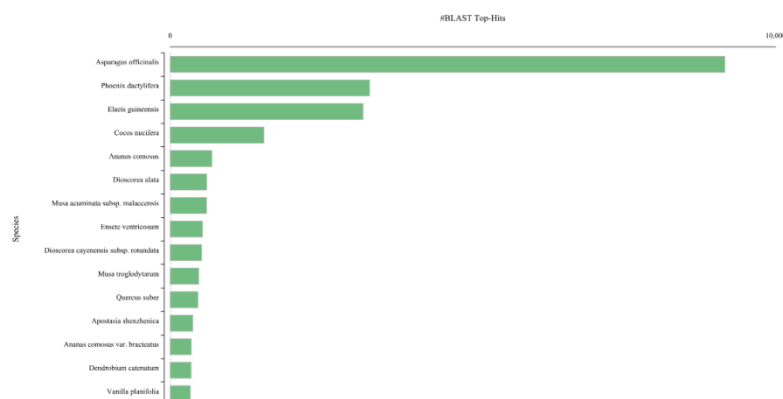
Table 3. Summary of the quantity and quality of read data for the saffron transcriptome reference

پارامترها Parameters	ارزش Value
Number of transcripts	63326
Size of the smallest transcript (nt)	200
Size of the largest transcript (nt)	16256
Number of bases (nt)	64651404
Mean length of the transcripts (nt)	9301020
Number of transcripts greater than 1kb	23146
Number of transcripts with ORF	22388
N90	482
N70	935
N50	1413
N30	2100
N10	3571
%GC	36.43



شکل ۱. نتایج BLASTX ترنسکرپتوم زعفران علیه پایگاه داده NR و نقشه‌یابی آن‌ها علیه پایگاه GO

Figure 1. BLASTX results of the saffron transcriptome against the NR database and their mapping to the GO database



شکل ۲. توزیع فراوانی گونه‌های با همولوژی بالا نسبت به ترنسکرپتوم زعفران

Figure 2. Frequency distribution of species showing high homology to the saffron transcriptome

به کار می‌برند. این مکانیسم‌ها با ژن‌های مقاومت گیاه (R genes) فعال می‌شوند. یکی از بزرگترین خانواده‌های ژن R در گیاهان، خانواده ژن NBS-LRR است که نقش مهمی در تشخیص سیگنال‌های بیماری ایفا می‌کنند (Dangl and Jones, 2001; Yue *et al.*, 2012). مطالعه این خانواده ژنی اطلاعات با ارزشی در مورد مکانیسم‌های ژنومی و مولکولی تنظیم ژن و عملکرد پروتئین در اختیار محققان قرار می‌دهد. نتایج این مطالعه، منجر به شناسایی ۳۰ توالی کدکننده NBS-LRR در پروفایل بیانی زعفران شد. تنوع در ساختار و توزیع اگزون-اینترون در بین اعضای خانواده ژن برای ظهور خانواده‌های ژنی متنوع بسیار مهم است و شواهد ارزشمندی برای روابط تکاملی ژن‌ها می‌دهد. در این مطالعه، توالی‌های اسیدآمینه کدکننده NBS-LRR برای شناسایی موتیف‌ها و ساختارهای دمین پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. این توالی‌ها به‌طور میانگین دارای ۲ تا ۶ دمین LRR بودند که طول تقریبی آن‌ها حدود ۲۰ تا ۶۰ اسیدآمینه بود. بیشترین تعداد موتیف (۱۵ موتیف) مربوط به توالی با شناسه contig-25817 بود و کمترین تعداد موتیف (۲ موتیف) در توالی با شناسه contig-29905 مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد اسیدآمینه کل به ترتیب مربوط به توالی با شناسه contig-۱۳۴۰۹ به تعداد ۱۲۰۴ اسیدآمینه و contig-۵۲۶۱۲ به تعداد ۴۲۸ اسیدآمینه بود. این نتایج بینش‌های مهمی را در مورد تنوع و تکامل ژن‌های NBS-LRR ارائه می‌دهد. همچنین در مطالعه مشابهی، السامان و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی بیان ژن‌های

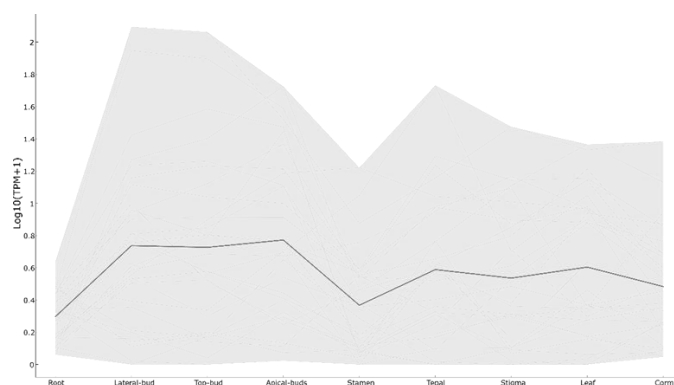
در یک مطالعه‌ی مشابه، درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی ژن‌های مختلف در فرآیند پاسخ بنه زعفران به آلودگی *F. oxysporum* در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ فوزاریوم پرداختند. نتایج حاصل از داده‌های RNA-seq این مطالعه نشان داد که از میان ۳۸۶۴۳ توالی مستندسازی شده، تعداد ۲۲۰۹ توالی دارای بیان افتراقی بودند که از این میان ۱۸۳۲ توالی کاهش و ۳۳۷ توالی افزایش بیان نشان دادند (Darvishian *et al.*, 2022). در همین راستا، لیو و همکاران (۲۰۲۳) پروفایل بیانی بنه‌های زعفران آلوده به قارچ فوزاریوم را در سه و شش روز بعد از آلودگی مورد مطالعه قرار دادند (Luo *et al.*, 2023). نتایج این مطالعه منجر به شناسایی تعداد ۸۴۵۴۴ یونی ژن و مستندسازی ۳۹۹۶۲ ژن گردید که از این میان تعداد ۱۴۲۶۳ ژن در روز سوم و تعداد ۱۶۳۹۷ ژن در روز ششم پس از آلودگی، بیان افتراقی داشتند (Luo *et al.*, 2023). همچنین مقایسه میان نتیجه‌ی ژن‌های مستندسازی شده حاصل از مطالعه‌ی لیو و همکاران (۲۰۲۳) و درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) با نتیجه مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در تعداد یونی ژن و مستندسازی آن‌ها وجود دارد که از دلایل این امر می‌توان به استفاده از مجموعه داده‌های پایگاه‌های ژنی از مطالعات قبلی و همچنین زمان نمونه‌برداری اشاره نمود (Darvishian *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2023).

شناسایی خانواده ژنی NBS-LRR

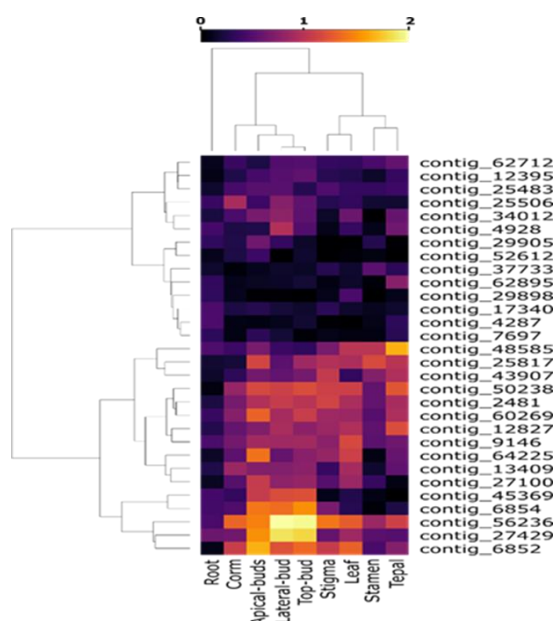
گیاهان مکانیسم‌های مختلفی برای دفاع در مقابل بیمارگرها

یک خانواده ژنی گیاهی تاثیر بگذارد (Zhang *et al.*, 2010). با توجه به شرایط کشت زعفران در مناطق خشک و نیمه خشک ایران، احتمالاً انتخاب طبیعی و بهنژادی از عوامل موثر بر تعداد خانواده ژنی NBS-LRR بوده‌اند. روند بیان ژن‌های شناسایی شده در بافت‌های مختلف زعفران در شکل ۳ ارائه شده است. بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌های مختلف زعفران نشان داد که ژن‌های شناسایی شده در انواع بافت جوانه بیشترین میزان بیان را داشتند (شکل ۳). همچنین گروه‌بندی ژن‌ها و بافت‌ها از نظر بیان در نقشه حرارتی در شکل ۴ آمده است. با توجه به نقشه حرارتی (شکل ۴) مشخص شد که ژن‌های شناسایی شده در دو گروه کلی قرار می‌گیرند؛ به طوری که ۱۶ ژن در گروه اول و ۱۴ ژن در گروه دوم جای گرفتند. همچنین نتایج نشان داد که مقادیر بیانی ثبت شده برای ژن‌های گروه اول بیشتر از مقادیر بیان برای ژن‌های گروه دوم بود. ژن‌هایی با شناسه contig-56236 و contig-27429 بالاترین میزان بیان را در بافت جوانه و ژن‌هایی با شناسه contig-48585 بالاترین میزان بیان را در بافت گلبرگ دارا بودند. کمترین میزان بیان در اکثر بافت‌ها مربوط به ژن‌هایی با شناسه contig-52612 و contig-29898 بود. علاوه بر این نتایج گروه‌بندی بافت‌های مختلف از نظر بیان ژن‌های شناسایی شده نشان داد که بافت ریشه در گروه مجزایی از سایر بافت‌ها قرار گرفت و کمترین میزان بیان را نسبت به سایر بافت‌ها داشت. پس از بافت ریشه، کمترین میزان بیان به ترتیب در بافت‌های پرچم و پیاز مشاهده شد. همچنین براساس تجزیه و تحلیل PCA (شکل ۵) بیان بافت ریشه بسیار متفاوت و دور از سایر بافت‌های زعفران بود و بنه و جوانه‌ها بیان تقریباً یکسانی داشتند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان بیان ژن‌های NBS-LRR در اندام‌های هوایی همچون جوانه‌ها بسیار بیشتر از اندام‌های زمینی مانند ریشه بود. بنابراین، نقش کلیدی این ژن در اندام‌های هوایی علیه بیمارگر گیاهی مشهود است.

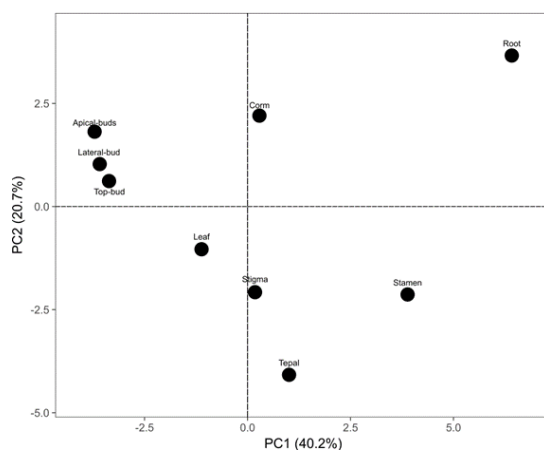
NBS-LRR و نقش کلیدی این ژن‌ها در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه نخود (*Lathyrus sativus*) پرداختند (Alsamman *et al.*, 2024). نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد ۲۷۶ ژن NBS-LRR شناسایی شد و از این تعداد ۱۲۴ ژن دارای دمین TNL و تعداد ۱۵۰ ژن دارای دمین CNL است. همه ژن‌ها شناسایی حاوی ۱ تا ۷ اگزون بودند (Alsamman *et al.*, 2024). با توجه به نقش عملکردی پروتئین‌های NBS-LRR در مقاومت به بیماری و بررسی ساختار ژنی در مطالعه حاضر و السامان و همکاران (۲۰۲۴) می‌توان سرخ‌های ارزشمندی برای مطالعه ویژگی‌های تکاملی، برهمکنش با پروتئین‌ها و فاکتورهای رونویسی، تفاوت و تنوع این خانواده ژنی بدست آورد. تعداد خانواده ژن‌های NBS-LRR در بین گونه‌های مختلف گیاهی بسیار متفاوت است و مطالعات متعددی نشان داده‌اند که هیچ ارتباط مستقیمی بین فراوانی ژن‌های NBS-LRR و اندازه ژنوم یا تعداد کل ژن‌های شناسایی شده وجود ندارد. در یک مطالعه که توسط مایرز و همکاران (۲۰۰۳) صورت گرفت، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن‌های کدکننده NBS وجود ۱۴۹ ژن کدکننده NBS-LRR را در آرآبیدوپسیس نشان داد (Meyers *et al.*, 2003). در مطالعه دیگری به تجزیه و تحلیل بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود در پاسخ به آلودگی (*Fusarium oxysporum f.sp. ciceri*) پرداخته شد. در مطالعه مذکور چهارده ژن NBS-LRR با بیان متفاوت در نخود شناسایی شدند که نشان از نقش مؤثر این ژن‌ها در مقاومت علیه بیماری پژمردگی فوزاریوم بود (Priyadarshini *et al.*, 2023). همچنین تعداد ژن‌های NBS-LRR بین گونه‌های گیاهی و حتی در زیرگونه‌های گیاهی که باهم قرابت ژنتیکی دارند تفاوت زیادی دارد (Alsamman *et al.*, 2023). به عنوان مثال، در خانواده سولاناسه تعداد ژن NBS-LRR در سیب‌زمینی حدوداً دو برابر بیشتر از ژن‌های موجود در گوجه‌فرنگی و فلفل است (Qian *et al.*, 2017). با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات پیشین باید به این نکته اشاره کرد که عوامل متعددی مانند اندازه ژنوم، توزیع و پراکنش ژن‌ها، انتخاب طبیعی و بهنژادی می‌توانند بر تعداد اعضای



شکل ۳. پروفایل بیان ژن‌های NBS-LRR شناسایی شده در بافت‌های مختلف زعفران
Figure 3. Expression profile of NBS-LRR genes identified in different tissues of saffron



شکل ۴. نقشه حرارتی بیان ژن‌های خانواده NBS-LRR در بافت‌های مختلف زعفران
Figure 4. Heat map of of NBS-LRR family gene expression across different saffron tissues



شکل ۵. تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) بیان ژن در انواع بافت‌های زعفران
Figure 5. Principal component analysis (PCA) of gene expression in different saffron tissues

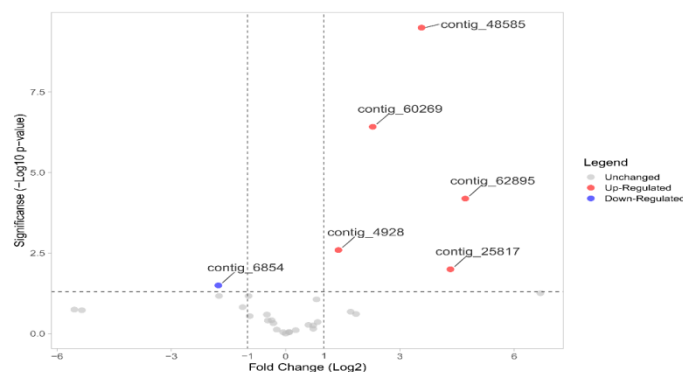
در تیمار ۷۲ ساعت نسبت به تیمار ۴۸ ساعت میزان بیان ژن‌ها بیشتر شده و به ترتیب در LRR1 بیشتر از LRR2 بوده و همینطور شاهد بیان کمتری در مقایسه با این دو ژن دارد (شکل ۷).

در گیاهان، ژن‌های متعددی در پاسخ به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شوند و همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش پیدا کند. بنابراین بررسی بیان متمایز ژن‌ها از جمله NBS-LRR یکی از روش‌های مهم برای مشخص کردن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است. میزان بیان بالا و پایین ژن NBS-LRR به عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی در پاسخ در بنه زعفران علیه بسیاری از بیمارگرها می‌باشد. در همین راستا مطالعه‌ای توسط احمد و همکاران (۲۰۲۴) به آنالیز گسترده ژنومی ژن‌های NBS-LRR در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر سوختگی آلترناریا پرداختند (Ahmed *et al.*, 2024). نتایج حاصل از داده‌های RNA-seq این مطالعه نشان داد که در تیمار ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، تعداد ۳۳۹۶ و ۲۳۲۳۹ توالی به ترتیب دارای بیان بالا و پایین بودند همچنین در تیمار ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، ۴۰۲۳ توالی کاهش و ۲۱۱۶ توالی افزایش بیان نشان دادند (Ahmed *et al.*, 2024). همچنین در این مطالعه خواص فیزیکوشیمیایی، ساختار ژن و تجزیه و تحلیل موتیف، هستی شناسی ژن‌ها و حاشیه نویسی عملکردی مورد بررسی قرار گرفت که نشان از اهمیت این ژن در برنامه‌های اصلاحی است.

بررسی روند تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده
بر اساس بررسی بیان این‌سلیکو (*in silico*) ژن‌های شناسایی شده (داده‌های بیانی به دست آمده از مطالعه لوو و همکاران (۲۰۲۳)، (شکل ۶) مشخص شد که از بین توالی‌های شناسایی شده، توالی‌هایی با شناسه contig_۴۸۵۸۵ و contig_۲۵۸۱۷ و contig_۶۲۸۹۵ و contig_۶۰۲۶۹ و contig_۴۹۲۸ پس از تیمار قارچی افزایش بیان و ژن‌هایی با شناسه contig_۵۸۵۴ بیان پایین‌تری نسبت به شاهد داشتند. بیشترین میزان افزایش بیان مربوط به contig_۶۲۸۹۵ و پس از آن به contig_۲۵۸۱۷ اختصاص داشت که از بین ژن‌هایی با بیان افتراقی بالا، این دو ژن به دلیل دارا بودن بیان بالاتر، برای آزمایش ریل تایم انتخاب شدند (Luo *et al.*, 2023).

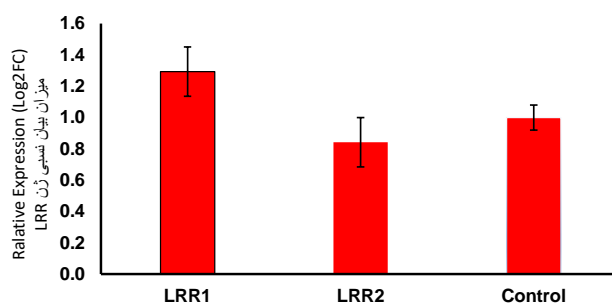
آنالیز بررسی بیان ژن NBS-LRR

موتیف LRR معمولاً در تعاملات پروتئین-پروتئین نقش دارد و مسئول شناسایی بیمارگرها است. در این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن‌های انتخاب شده (contig_۶۲۸۹۵ و contig_۲۵۸۱۷) پس از انجام واکنش Real time-PCR و آنالیز داده‌ها به روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. با توجه به شکل‌های ۷ و ۸ می‌توان چنین اظهار نمود که در هر دو ژن تیمار ۴۸ ساعت بیان کمتری نسبت به تیمار ۷۲ ساعت داشته است و همچنین در تیمار ۴۸ ساعت و تیمار ۷۲ ساعت بیان ژن LRR1 در مقایسه با LRR2 بیشتر شده است. در تیمار ۴۸ ساعت با توجه به شکل ۷ میزان بیان LRR1 بیشتر بوده و همینطور بیان شاهد نسبت به LRR2 بالاتر است.

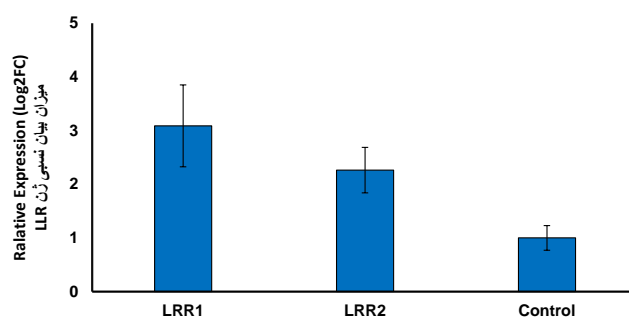


شکل ۶. نمودار آتشفشانی ژن‌های منتخب با بیان افتراقی

Figure 6. The volcanic plot for selected differentially expressed genes (DEGs)



شکل ۷. بیان نسبی ژن‌های NBS-LRR مربوط به بنه زعفران ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*
Figure 7. Relative expression of the NBS-LRR gene in saffron corms 48 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*



شکل ۸. بیان نسبی ژن NBS-LRR مربوط به بنه زعفران ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*
Figure 8. Relative expression of the NBS-LRR gene in saffron corms 72 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*

بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان در برابر تنش نقش داشتند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر و محمودی و همکاران (۲۰۲۴) نشان دهنده وجود یک شبکه تنظیم کننده ژن را در مسیرهای برهمکنش گیاه با بیمارگر نشان می‌دهد (Mahmoodi et al., 2024).

بنابراین تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم در شناسایی به موقع بیمارگر مهاجم و فعال‌سازی سریع و موثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است که احتمالاً بیان بالای ژن LRR1 در مقایسه با LRR2 نشان دهنده نقش مهم این ژن در پاسخ اولیه گیاه به آلودگی قارچی است. همچنین روند بیان متفاوتی LRR نسبت به شاهد می‌توان به مکانیسم مولکولی متفاوتی برای درک و کنترل بیمارگر اشاره نمود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دوره زمانی برای ارزیابی پاسخ‌های متفاوت گیاه به آلودگی بیمارگر متفاوت است. بنابراین بیان و تنوع بالای دمین‌های LRR و با توجه به نقش آن‌ها در شناسایی سیگنال‌های ژن Avr می‌تواند به افزایش مقاومت گیاه علیه نژادهای خاص بیمارگرها کمک شایانی کند.

مقایسه نتایج حاصل از واکنش Real time-PCR در هر دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که LRR1 (contig_۶۲۸۹۵) بیان بالاتری نسبت به LRR2 (contig_۲۵۸۱۷) نشان می‌دهد و بیان در بازه زمانی ۷۲ ساعت بیشتر از بیان ۴۸ ساعت بود. بیان ژن‌های LRR1 در بازه زمانی بیشتری بعد از تلقیح با قارچ فوزاریوم بیان می‌شود (شکل‌های ۷ و ۸) و احتمالاً این ژن‌های نقش مهمی در فعال کردن مکانیسم دفاعی گیاه علیه بیمارگر دارد که با نتایج احمد و همکاران (۲۰۲۴) مطابقت دارد (Ahmed et al., 2024). همچنین در مطالعه‌ای توسط محمودی و همکاران (۲۰۲۴) با هدف شناسایی و بررسی بیان ژن‌های IncRNA در گیاهچه‌های سیب زمینی آلوده به ویروس PVY پرداختند (Mahmoodi et al., 2024). نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۷۶۹ عدد ژن با بیان افتراقی، تعداد ۳۱۰ ژن کاهش بیان و ۴۵۹ عدد ژن افزایش بیان نشان دادند. طبق نتایج این بررسی، تعداد زیادی از ژن‌های هم بیان با IncRNA‌های پیش‌بینی شده در فرآیندهای

seq صورت گرفت. نتایج این مطالعه منجر به مستندسازی تعداد ۶۳۳۲۶ ژن شد. از بین این ژن‌های مستندسازی شده، بیشترین و کمترین بیان ژن‌ها به ترتیب مربوط به بافت جوانه و ریشه بود. از بین این ژن‌های مستندسازی شده، بیشترین بیان ژن‌ها در بافت جوانه مشاهده شد و کمترین بیان بعد از ریشه مربوط به بافت‌های پرچم و پیاز بود. همچنین در این مطالعه، با بررسی میزان بیان ژن NBS-LRR مقاومت گیاه زعفران در برابر آلودگی به قارچ فوزاریوم در مرحله دفاعی ETI که ایمنی ناشی از افکتور است، سنجیده شد. این یافته‌ها بینش‌های مهمی را در مورد NBS-LRRهای در پاسخ به بیمارگر پژمردگی فوزاریوم ارائه می‌دهند، که می‌توانند به عنوان اهداف محوری برای برنامه‌های مولکولی و مهندسی ژنتیک با هدف افزایش مقاومت به بیماری در گیاه زعفران باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

زعفران از مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان است که به دلایلی از جمله نیاز آبی کم، سهولت در عملیات کشت و کار، سودآوری، به صورت گسترده‌ای در ایران و برخی دیگر از کشورها کشت می‌شود. چون تکثیر زعفران از طریق کشت بنه صورت می‌گیرد و بنه‌ها چندین ساله در خاک مزارع ماندگار هستند، از این رو، بیماری پوسیدگی ناشی از قارچ فوزاریوم کشت این گیاه با ارزش را تهدید می‌کند. توسعه واریته‌های مقاوم به بیماری می‌تواند یکی از راهکارهای موثر در این زمینه باشد. بنابراین کاوش و شناسایی ژن‌های مرتبط در پاسخ‌های دفاعی گیاه کمک زیادی به مدیریت بیمارگرهای گیاهی می‌کند. در این مطالعه به بررسی تغییرات ترنسکریپتوم و شناسایی خانواده‌ی ژنی مهم NBS-LRR در بنه گیاه زعفران در پاسخ ایمنی علیه بیمارگرهای قارچی *Fusarium oxysporum sp. Gladioli* پرداخته شد. تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم بنه زعفران با استفاده از روش‌های RNA-

References

- Ahmad, T., Bashir, A., Farooq, S., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2022). Burkholderia gladioli E39CS3, an endophyte of Crocus sativus Linn., induces host resistance against corm-rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 495-508.
- Ahmed, R., Dey, K. K., Senthil-Kumar, M., Modi, M. K., Sarmah, B. K., & Bhorali, P. (2024). Comparative transcriptome profiling reveals differential defense responses among Alternaria brassicicola resistant Sinapis alba and susceptible Brassica rapa. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1251349.
- Alsamman, A. M., Mousa, K. H., Nassar, A. E., Faheem, M. M., Radwan, K. H., Adly, M. H., Elakkad, T. A. (2023). Identification, characterization, and validation of NBS-encoding genes in grass pea. *Frontiers in Genetics*, 14, 1187597.
- Chiang, Y.-H., & Coaker, G. (2015). Effector triggered immunity: NLR immune perception and downstream defense responses. *The Arabidopsis Book*, 13-19.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826-833.
- Darvishian, A., Nazarian-Firouzabadi, F., Darvishnia, M., & Ismaili, A. (2022). Transcriptome analysis of saffron corm in response to the most important fungal infection. *ph.D Thesis, Lorestan University*.
- Fallahzadeh, M. V. (2018). Innate immunity in plants. *Biology, Environmental Science*, 343-361.
- Golmohammadi, F. (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics, and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(5), 566-596.
- Hu, J., Liu, Y., Tang, X., Rao, H., Ren, C., & Chen, Pei, J. (2020). Transcriptome profiling of the flowering transition in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientific reports*, 10(1), 9680.
- Jacob, F., Vernaldi, S., & Maekawa, T. (2013). Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in immunology*, 4, 297.
- Keen, N. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics*, 24, 447-463.

- Khaledi, N. (2020). Evaluation of cell wall degrading enzymes of *Fusarium* species associated with root and corm of saffron in South Khorasan province. *Saffron agronomy and technology*, 8(2), 243-259.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lolle, S., Stevens, D., & Coaker, G. (2020). Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling. *Current opinion in immunology*, 62, 99-105.
- Luo, J., Zhang, A., Tan, K., Yang, S., Ma, X., Bai, X., & Bai, J. (2023). Study on the interaction mechanism between *Crocus sativus* and *Fusarium oxysporum* based on dual RNA-seq. *Plant Cell Reports*, 42(1), 91-106.
- Mahmoodi, E., Nasrollahnejad, S., Ahmadvand, R., & Tohidfar, M. (2024). We are identifying and predicting the function of long non-coding RNAs in the expression profile of PVY-infected potatoes. *Agricultural biotechnology journal*. Electronic ISSN: 2228-6500. P118-130.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(4), 809-834.
- Priyadarshini, P., Sahu, S., Kalwan, G., Yadava, Y. K., Nagar, R., Rai, V., ... & Jain, P. K. (2023). Unraveling the mechanism of *Fusarium* wilt resistance in chickpea seedlings using biochemical studies and expression analysis of NBS-LRR and WRKY genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 124, 101958.
- Qian, L.-H., Zhou, G.-C., Sun, X.-Q., Lei, Z., Zhang, Y.-M., Xue, J.-Y., & Hang, Y.-Y. (2017). Distinct patterns of gene gain and loss: Diverse evolutionary modes of NBS-encoding genes in three Solanaceae crop species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(5), 1577-1585.
- Saeedi Rad, M. H., Mahdinia, A., & Neshat, S. Z. (1400). Challenges and solutions to develop the mechanization of saffron cultivation. *Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education center*, 3, 17-24.
- Shah, Z. A., Mir, R., Matoo, J. M., Dar, M. A., & Beigh, M. (2017). Medicinal importance of saffron: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2475-2478.
- Van Der Biezen, E. A., & Jones, J. D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences*, 23(12), 454-456.
- Yue, J. X., Meyers, B. C., Chen, J. Q., Tian, D., & Yang, S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytologist*, 193(4), 1049-1063.
- Zhang, M., Wu, Y.-H., Lee, M.-K., Liu, Y.-H., Rong, Y., Santos, T. S., ... Zhang, H.-B. (2010). Numbers of genes in the NBS and RLK families vary by more than four-fold within a plant species and are regulated by multiple factors. *Nucleic Acids Research*, 38(19), 6513-6525.
- Zhou, T., Wang, Y., Chen, J.-Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., & Tian, D. (2004). Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 402-415.