ترانسکریپتومیکس و روش های پرکاربرد بررسی بیان ژن‌های دفاعی گیاه

جلال غلام نژاد*

دکتری بیماری شناسی گیاهی، استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰)

چکیده

ترانسکریپتومیکس یکی از زمینه‌های پیشرفته در زمینهٔ علوم بعد از ژنومیک است. علم ترانسکریپتومیکس بر روی میزان بیان ژن‌ها با بررسی سطوح RNA تمرکز می‌کند. ترانسکریپتومیکس اطلاعات زیادی را در مورد ژنوم، ساختار ژن‌ها و عملکرد ژن‌ها فراهم می‌آورد و با استفاده از این اطلاعات مکانیسم‌های مولکولی که در فرایندهای بیولوژیکی مختلف سلولی رخ می دهد آشکار می‌شود. گیاهان بعد از درک بیمارگر سیستم دفاعی خود را فعال می‌کنند. امروزه ترانسکریپتومیکس کاربرد وسیعی در کشاورزی پیدا کرده و با استفاده از این علم پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، بیماری‌های انباری و شناسایی ارقام مقاوم در بیماری شناسی گیاهی مطالعه می‌شود. بررسی بیان ژن‌ها در زمان تنش و شناسایی ژن‌های دفاعی نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج تحقیقات ترانسکریپتومیکس در مورد بیان ژن، اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرهای گیاهی را افزایش داده و تولید ارقام مقاوم و متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می سازد. روش‌های مختلفی جهت تجزیه پروفایل بیان ژن در گیاهان وجود دارد. روش‌هایی که برای مطالعهٔ بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد به سه دستهٔ روش‌های متکی بر هیبریداسیون، روش‌های مبتنی بر PCR و روش‌های متکی بر توالی یابی تقسیم می‌شوند. در این مقاله مروری بر روش های مطالعهٔ بیان ژن‌ها و کاربردهای آن در بیماری شناسی گیاهی پرداخته می شود.

کلیدواژگان

بیان ژن دفاعی، بیماری گیاهی، ترانسکریپتومیکس، میکرواری، نوردرن بلات، Real time PCR.

* رایانامه نویسنده: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

مقدمه

ترانسکریپتومیکس یکی از زمینه‌های پیشرفته در زمینهٔ علوم بعد از ژنومیک (post-genomic) است. در واقع ترانسکریپتوم به مجموعهٔ نسخه های RNA در نوع خاصی از یک سلول یا بافت در شرایط ویژه‌ای از نمو یا تحت شرایط فیزیولوژیکی خاص اتلاق می‌شود و شامل RNA های پیغامبر (messenger RNA)، RNAهای انتقال دهنده (transfer RNA)، RNA ریبوزومی (ribosomal RNA)، و دیگر RNAهای غیر کد کننده (non-coding RNA) می شوند. ژنوم در تمامی سلول‌های یک موجود زنده، به استثنای موجودات جهش یافته، ثابت است، تحت شرایط مختلف الگوی بیان ژن‌ها تغییر خواهد کرد، اما ترانسکریپتوم در سلول‌های مختلف متغییر است. به بیان دیگر، ترانسکریپتوم هر سلول الگوی بیانی ژن‌هایی است که به طور فعال در زمانی خاص بارز می شوند؛ تخریب mRNA نیز بر وی ترانسکریپتوم تأثیر دارد. علم ترانسکریپتومیکس بر روی میزان بیان ژن‌ها با بررسی سطوح RNA تمرکز می‌کند (۱). ترانسکریپتومیکس اطلاعات زیادی را در مورد ژنوم، ساختار ژن‌ها و عملکرد ژن‌ها فراهم می‌آوردو با استفاده از این اطلاعات مکانیسم‌های مولکولی که در فرایندهای بیولوژیکی مختلف سلولی رخ می دهد آشکار می‌شود. با توسعهٔ فناوری توالی‌یابی در مقیاس وسیع، آنالیز ترانسکریپتوم سلولی تسهیل شده است و باعث درک بهتر محققین از شبکه‌های تنظیم ژن بر اساس RNA شده است (۲).

الگوی دقیق و کنترل شده که باعث بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های متفاوت و زمان متفاوت می شود، الگوی بیان ژن نامیده می شود. بیان متفاوت ژن‌ها در سلول‌ها باعث تفاوت سلول‌های برگ و ریشه در گیاه و یا در انسان موجب تفاوت سلول‌های کبد و ماهیچه می شود، و همچنین باعث تفاوت یک سلول سالم از یک سلول سرطانی می شود. اما سوالی که در اینجا پیش می‌آید این است که چطور محققان متوجه شوند کدام ژن‌ها روشن هستند و همچنین این ژن‌ها چه موقع روشن یا خاموش می‌شوند. بیان ژن یکی پدیدهٔ فعال است، و ژن‌های یکسان ممکن است تحت شرایط مختلف به صورت‌های مختلفی عمل نمایند. به بیانی دیگر، می‌توان متصور شد که دو ارگانیسم دارای ژنوتیپ‌های یکسانی هستند ولی فنوتیپ‌های متفاوتی را بروز می دهند که این تفاوت به علت تفاوت در بیان ژن‌های مختلف است (۳).

برای جواب دادن به سوالات مختلف در مورد بیان ژن‌ها به خصوص ژن‌های دفاعی در گیاهان در شرایط تنش و بدون تنش، محققان اغلب از روش‌های آزمایشگاهی مانند نوردرن بلات و یا از روش آنالیزهای سریالی از بیان ژن (SAGE) استفاده می کنند. اکثر این روش‌ها این امکان را به وجود می آورد که ژن‌هایی که در سلول روشن و خاموش می شوند را مورد شناسایی قرار داد؛ و به دنبال آن، این اطلاعات می تواند نشان دهندهٔ شرایطی باشد که باعث بیان این ژن‌ها شده است (۴).

گروه‌های اصلی آفات و بیماری‌هایی که به گیاهان خسارت وارد می‌کنند شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها، ویروس‌ها و حشرات می‌باشند. گیاهان از طریق ابزار مختلف، از جمله سدهای ساختاری که به عنوان موانع فیزیکی عمل می‌کنند و همچنین با تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضدمیکروبی، از خود محافظت می کند (۵). گیاهان می‌توانند بعد از درک بیمارگر سیستم دفاعی خود را فعال کنند. سرعت این فرایند یکی از عوامل بسیار مهم در موفقیت وقوع مقاومت در گیاهان است.

فعال شدن ژن‌های مقاومت (Resistant genes) منجر به ایجاد تغییرات بعدی می‌شود که این تغییرات هم در مکان آلودگی و هم به صورت سیستمیک در سراسر گیاه رخ می‌دهد و باعث ایجاد تغییرات فیزیکی

در سلول‌ها مانند ساخت بیشتر لیگنین و بالا رفتن استحکامات گیاه می‌شود (۶). مهم‌ترین قسمت دفاع موثر گیاه در برابر بیمارگرها، القای سریع ژن‌های دفاعی گیاه است. یک گروه عمده از ژن‌های دفاعی ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی PR (Pathogenesis-related PR proteins) هستند. در حالی‌که عملکرد تعدادی از ژن‌های PR پروتئین، هنوز نامشخص است ولی تعدادی از آن‌ها فعالیت کیتینازی و گلوکانازی دارند که این مواد به ترکیبات دیوارهٔ سلولی قارچ‌ها حمله می‌کنند. سایر ژن‌های دفاعی القا شونده شامل دیفنسین‌ها، آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز فیتوآلکسین‌ها، آنزیم‌های محافظت کننده از گیاه و اجزاء انتقال پیام مانند عوامل رونویسی اختصاصی هستند (۷).

القای ژن‌های دفاعی در گیاهان در پاسخ به بیمارگرها، در مرتبهٔ اول در سطح رونویسی رخ می‌دهد و در مرتبه دوم تنظیم الگوهای بیان زمانی و مکانی ژن های دفاعی مهم‌ترین قسمت از دفاع گیاهی به شمار می‌رود. شناسایی اجزای انتقال پیام برای بیان ژن‌های دفاعی گیاه شامل عوامل رونویسی کلیدی مهم این امید را به وجود آورده است که این عوامل ابزار مناسبی جهت افزایش مقاومت گیاه در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها هستند. بیشتر دستاوردهایی که در این حوزه به دست آمده در مورد گیاه مدل آرابیدوپسیس بوده است، و در نهایت منجر به انتقال این نتایج به گیاهان زراعی با استفاده از روش های DNA نوترکیب خواهد شد (۸).

مسیرهای ارسال پیام درگیر در بیان ژن‌های دفاعی گیاه توسط چندین مولکول پیام‌رسان دفاعی از جمله اسیدسالیسیلیک، اتیلن، اکسید نیتریک (NO)، اسید جاسمونیک و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند پراکسید هیدروژن تنظیم می‌شوند. ROS و NO مولکول‌های مهم ارسال پیام در طول واکنش فوق حساسیت می‌باشند و به نظر می‌رسد فعالیت آن‌ها در کنار هم باعث مرگ موضعی سلول‌های گیاهی می‌شود. افزایش معنی‌دار سطوح اسیدسالیسیلیک در محل آلودگی و به میزان کمتر در قسمت‌های دیگر گیاه و همچنین استفاده از اسیدسالیسیلیک به صورت پاشش بر روی گیاه باعث افزایش مقاومت گیاه در مقابل بسیاری از عوامل بیماری‌زا می‌شود. گیاهان تراریختی که با داشتن یک آنزیم باکتریایی تبدیل کننده اسیدسالیسیلیک به فرم غیر فعال آن قادر به تجمع اسیدسالیسیلیک نیستند، نمی‌توانند مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR)و القای ژن‌های دفاعی را توسعه دهند (۹). با بررسی بیان ژن‌های دفاعی دانشی جدید و قدرتمند برای شناسایی سریع ژن‌های دفاعی و تغییرات آن‌ها در شرایط مختلف تنش با بیمارگر به دست می‌آید (۱۰).

در ابتدای ظهور بررسی بیان ژن‌ها، محققان بیشتر بیان یک ژن یا تعداد کمی ژن را در یک دورهٔ زمانی مورد مطالعه قرار می‌دادند. به مدد روشهای جدید اخیراً روش‌هایی که مطالعهٔ تعداد بسیار از ژن‌ها را امکان پذیر می‌سازند مورد استفاده قرار می گیرند. خوشبختانه روش‌های جدید مطالعات بیان ژن‌ها را در مقیاس وسیع ممکن ساخته است (۱۱، ۱۲، ۱۳).

در واقع بررسی بیان ژن‌های دفاعی گیاهی در زمان تنش نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرها را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می سازد. روش‌های مختلفی جهت تجزیه پروفایل بیان ژن در گیاهان از وجود دارد، که در ادامه به مهم‌ترین روش‌هایی که در این مسیر وجود دارد اشاره می‌شود.

روش‌های بررسی بیان ژن‌های دفاعی در گیاه

روش‌هایی برای تعیین کمیت و کیفیت ترانسکریپتوم ها وجود دارد که به سه صورت کلی تقسیم می شوند:

الف) روشهای متکی بر هیبریداسیون (Hybridization-based approaches):

۱. نوردرن بلات (Northern blot) و نوردرن بلات معکوس

۲. روش ریزآرایه (Microarray[1])

ب) روش های مبتنی بر پی‌سی ار (PCR):

۱. PCR نیمه کمی

۲. PCR زمان واقعی (Real time PCR)

ج) روشهای متکی بر توالی یابی (Sequencing-based approaches):

۱. توالی یابی سنگر

۳. روش سریالی آنالیز بیان ژن (SAGE)

۴. روشMPSS

۵. روش توالی یابی RNA

الف) روشهای متکی بر هیبریداسیون

نوردرن بلات (Northern blot) و نوردرن بلات معکوس

تعداد نسخه‌های mRNA در مورد هر ژن منحصر به فرد دقیقاً نشان دهندهٔ میزان بیان آن ژن مورد نظر است. ردیابی کمیت بیان یک ژن در نهایت نشان دهندهٔ شدت نسخه برداری از آن ژن و بیان آن است. روش نوردرن بلات یکی از اولین روش‌ها جهت نشان دادن اختلاف در تعداد mRNA هایی که به وسیلهٔ هر ژن تولید می شود. نوردرن بلاتینگ روشی است برای ردیابی توالی خاصRNA کاربرد دارد. این روش توسط جیمز آلوین و جوج استارک در دانشگاه استندفورد در سال ۱۹۷۹ ابداع شد. نام این روش به صورت متضاد از نام ساترن بلاتینگ گرفته شده است (۱۴). در این روش ابتدا mRNA از نمونه های بیولوژیکی استخراج و سپس این mRNA از بقیه مواد سلولی شامل DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و دیگر محتویات سلولی جداسازی خواهد شد. قطعات مختلف mRNA به وسیلهٔ ژل الکتروفورز از هم جدا می‌شوند (روشی است که مولکول ها را بر اساس وزن و بار الکتریکی از هم جدا می سازد) و سپس این قطعات به یک غشا منتقل که به این روش لکه گذاری (Blotting) گفته می شود. برای شناسایی نسخه هایی از mRNA که به وسیلهٔ ژن خاصی، که بطور مثال تحت شرایط تنش بیمارگر بوده است، تولید می شود، نمونه ها را با یک قطعهٔ کوچک به نام شناساگر (Probe) از توالی های یک رشته ای RNA یا DNA گرماگذاری کرده و این مولکول با استفاده از مولکول های رادیواکتیو نشاندار می‌شوند (۱۵).

پروب یا شناساگر بر اساس توالی mRNA ژن مورد نظر طراحی و سپس به توالی مورد نظر باند می شود. بعد از اینکه پروب با توالی مورد نظر باند شد این پروب در معرض اشعهٔ X قرار می گیرد، و اشعه متصاعد شده از آن باعث ایجاد لکه بر روی فیلم رادیولوژی میگردد. شدت علامتی که بر روی فیلم عکاسی نقش بسته است به محققان نشان می دهد که مقدار mRNA در نمونه اولیه به چه میزان بوده است، و این موضوع به وسیلهٔ شدت این لکه مشخص می شود، در این روش از ژنی که بیان آن در طی تنش همواره ثابت می‌ماند به عنوان ژن خانه‌دار استفاده می‌شود (۱۶).

روش دیگری که برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده می‌شود نوردرن بلات معکوس است. نوردرن بلات معکوس یک نوع از نوردرن بلات است که در آن اسید نوکلئیک به صورت ثابت روی یک غشاء لکه‌گذاری می‌شود، در صورتی‌که این لکه مجموعه‌ای از قطعات cDNA تکثیرشده یا ژن هدف مورد نظر است. در این روش بعد از اینکه DNA بر روی غشا لکه گذاری شد با استفاده از پروب‌های cDNA ساخته شده از RNA های استخراج شده از بافت‌ها واکنش هیبریداسیون یا دو رگ‌گیری انجام می‌شود. بنابراین از این روش به صورت معمول، جهت بررسی پروفایل بیانی ژن‌ها و همچنین جهت بررسی بیان تعداد زیادی ژن در یک ارگانیسم استفاده می‌شود (۱۷).

مزیت‌های نورترن بلاتینگ

- روشی استاندارد و تکرارپذیر در مورد مطالعه میزان بیان ژن
- شناسایی اندازهٔ mRNA
- قابلیت مطالعه بر روی اسپلایسینگ RNA
- امکان مطالعه بر روی نیمه عمرRNA
- در این روش از پروب‌های ناقص نیز می‌توان استفاده نمود.
- بعد از اتمام واکنش نوردرن غشا را می‌توان نگه داشت و سال‌ها بعد دوباره بازبینی و همچنین دوباره پروب‌گذاری کرد (۱۸)

معایب نورترن بلاتینگ

- شناسایی چند پروبی مشکل است.
- اگر نمونهٔ ما حتی به میزان اندک با آنزیم RNAaseآسیب ببیند کیفیت جواب‌ها و میزان بیان‌ها دچار مشکل منفی کاذب می‌شوند.
- روش استاندارد نورترن بلاتینگ حساسیت کمتری نسبت به روش‌های دیگر مانند Real Ttime -PCR دارد (۱۹).

در سال ۱۳۹۰ مطالعه‌ای با عنوان مقایسه واکنش بیان ژن‌های القایی در پاسخ به تیمارهای تنش زا در اسفناج و کلزا به وسیلهٔ Navabpoor و همکاران انجام شد. در این مطالعه، سه تیمار متیل وایلوژن، نیترات نقره و تری آمینوترایزول با چهار غلظت متفاوت به همراه شاهد و تیمار ترکیبی (اسید اسکوربیک+ تیمارهای تنش‌زا) استفاده شدند. سنجش TBARM به منظور ارزیابی میزان سطح اکسیداسیون سلولی انجام شد. نمونه برداری در زمانهای ۶،۱۲،۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال کلیهٔ تیمارها انجام شد. مطالعهٔ بیان ژن و هیبریداسیون نورترن بلات در زمان ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمارها صورت پذیرفت. نتایج نشان داد کلیهٔ تیمارهای آزمایشی از طریق افزایش نسبی سطح رادیکالهای آزاد اکسیژن در مقدار درصد سلولهای مرده، میزان TBARM و روند بیان ژن‌ها تأثیر می‌گذارند. ژن فتوسنتزی روبیسکو (RBCS) با افزایش غلظت تیمارهای تنش کاهش فعالیت داشت. اسپری پیش تیمار اسیداسکوربیک منجر به افزایش بیان نسبی این ژن تا حد ۵۰ درصد گردید. در مورد سایر ژن‌های مورد مطالعه اگرچه تفاوتهایی در الگوی بیان بسته به نوع گیاه و تیمارهای آزمایشی دیده شد، اما عموماً نسبت به تیمارهای تنش‌زا واکنش مثبت نشان داده و با افزایش غلظت تیمارها حداقل تا سطح ما قبل آخرتیمار افزایش خطی بیان ژن مشاهده گردید (۲۰).

در سال ۱۳۹۳ مطالعهٔ با عنوان بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک روی علایم بیماری و میزان بیان ژن‌های دفاعی گندم پس از آلودگی با قارچ بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* به وسیلهٔ Gholamnezhad و همکاران انجام گرفت. در این پژوهش تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روی تغییرات بیان ۴۳ ژن‌های دفاعی درگیر در مقاومت گندم‌های تلقیح شده با بیمارگر *M. graminicola* به روش نیمه کمی نوردرن بلات معکوس بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد از مجموع ۴۳ ژن منتخب مطالعه شده با ۳۴ ژن (۸۶ درصد) در رقم متحمل زاگرس در تیمار قارچ و همچنین تیمار توأم قارچ واسیدسالیسیلیک افزایش بیان نشان دادند. از میان ژن‌های مورد مطالعه بیشترین میزان بیان را ژن کاتالاز داشت (۲۱). در سال ۲۰۱۶ سه تحقیق به وسیلهٔ غلام نژاد و همکاران با عناوین ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن‌های خانه‌دار در برهمکنش گندم با بیمار گر Mycosphaerella graminicola، بررسی تغییرات بیان ژنهای رمز کنندهٔ پروتئینهای شوک حرارتی Hsp ۷۰ وHsp۹۰ در پاسخ به آلودگی به M. graminicola و همچنین بررسی تغییرات بیان ژن رمز کنندهٔ پروتئین Ethylene insensitive 3 در پاسخ به آلودگی به M. graminicola

با استفاده از روش Reverse northern dot blot انجام گرفت. نتایج این تحقیقات به ترتیب بیانگر بیشترین ثبات در بیان ژن توبولین، تغییر افزایشی بیان دو ژن رمز کنندهٔ پروتئینهای شوک حرارتی ۷۰ Hsp وHsp۹۰ و همچنین کاهش بیان ژن رمز کنندهٔ پروتئین Ethylene insensitive 3 در طول ۲۴ ساعت بعد از تلقیح این بیمارگر بود (۲۲، ۲۳، ۲۴). در مطالعه‌ای که به وسیلهٔ Ray و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام شد بیان ژن‌های درگیر در مقاومت به بیماری سوختگی برگ گندم با استفاده از روش Real time RT-PCR و آنالیز نوردرن بلات مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در رقم مقاوم، ژن PDI (Protein Disulfide Isomerase) در سه ساعت اول بعد از آلودگی بیان می‌شود در حالی‌که افزایش بیان در رقم حساس، ۹۶ ساعت بعد از آلودگی اتفاق می‌افتد. همچنین مطالعات آن‌ها نشان داد که روند تعامل گیاه و قارچ در ۲۴ ساعت اول بعد از مایه‌زنی مشخص می‌شود (۲۵).

روش ریزآرایه (Microarray)

ریزآرایه‌ها، یکی از اولین ابزارهای دارای توان بالا (High- Throughput) برای بررسی ترانسکریپتوم ها در طول دو دهه گذشته بوده است (۲۶). در این روش با ایجاد هزاران پروفایل از ژن ها به طور همزمان باعث می شود که مطالعه آنالیز ترانسکریپت ها بهبود یابد (۲۷). تکنولوژی میکروواری را می توان به سه بخش کلی تقسیم نمود:

بخش اول: طراحی و تهیه چیپ

در این مرحله ابتدا باید اطلاعات لازم از توالی ژن‌هایی که قرار است بررسی شوند، گردآوری و سپس، قطعه‌ای از توالی منحصر به فرد ژن با طولی در حد ۲۵ جفت باز ساخته شود. با قرار دادن این پروب ها بر روی یک اسپات، در نهایت می‌توان حدود ۱۰۰۰۰ اسپات را روی یک چیپ قرار دارد و وراد آزمایش کرد، البته چیپ‌ها به صورت آماده در مورد ژن‌های تعدادی از موجودات در بازار وجود دارد (۲۸).

بخش دوم: آماده سازی واکنش

این بخش شامل استخراج mRNA و ساخت cDNA از روی آن و همزمان نشان دار کردن آن با یک رنگ فلورسانس، مراحل هیبریداسیون، شستشو و خشک کردن چیپ و در نهایت اسکن کردن چیپ میکروواری می باشد. در این مرحله پس از انتخاب سلول یا بافتی که قرار است مطالعه شود، mRNA از آن استخراج و سپس cDNA از روی mRNA های استخراج شده ساخته می شود، سپس دو جمعیت از cDNA های نشاندار شده باهم مخلوط می شوند و هیبریداسیون با یک چیپ DNA انجام می شود. در این مرحله شرایط هیبریداسیون و همچنین تنظیم دماهای مختلف بسیار حائز اهمیت است (۲۹).

بخش سوم: آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش

آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش به کمک نرم افزارها و سخت‌افزارهای مربوطه و بانک‌های اطلاعاتی موجود می‌باشد. با اندازه گیری اختلاف شدت بین این دو رنگ برای هر نقطه می توان نتایج را آنالیز نمود و در نهایت الگوی بیان ژنی را در هر نوع سلول ترسیم نمود (۲۹).

این سه بخش، کاملاً به یکدیگر وابسته بوده و باید سعی شود که به درستی انجام شود زیرا در غیر این صورت نتیجه مناسبی از آزمایش حاصل نخواهد شد. با توجه به متنوع بودن قالب‌ها و انواع مختلف چیپ‌های میکروواری، در بخش آنالیز داده‌های میکروواری الگوریتم‌ها و روش‌های آنالیزی زیادی ارائه شده است (۶).

آنالیز میکروواری به محققین علوم زیستی اجازه می‌دهد تا آزمایشات خود را در کوتاه‌ترین زمان و در

مقیاس وسیع انجام دهند. با این حجم وسیع اطلاعات از میزان بیان ژن‌ها می‌توان به روابط بین DNA، RNA و پروتئین پی برد و با سایر موجودات در طول تکامل مقایسه نمود. برای موجودات مختلف مانند انسان، موش، گیاه ارابیدوپسیس و تعداد دیگری از موجودات کیت‌های از قبل آماده شده وجود دارد. میکروآری در شاخه‌های مختلف علم مانند پزشکی، صنایع دارویی و غذایی و همچنین علوم کشاورزی کاربرد دارد. این روش در علم پزشکی در تشخیص سرطان‌ها و همچنین بیمارگرهای میکروبی و ویروسی بسیار کارآمد است. این روش در کشاورزی برای تشخیص بیمارگرهای گیاهی و همچنین ردیابی میزان تغییرات بیان ژن‌هایی که در فرایند مقاومت به بیماری‌ها نقش دارند به کار می‌رود (۳۰).

در سال ۲۰۰۸ پژوهشی با عنوان شناسایی ژن‌های دفاعی در گیاه کلزا با استفاده از cDNA میکروآری مربوط به گیاه مدل ارابیدوپسیس انجام گرفت. در این مطالعه، تغییراتی که در فراوانی ۲۳۷۵ نسخهٔ برچسب بیانی یا EST گیاه ارابیدوپسیس را، در مورد گیاه کلزا در برهمکنش با قارچ‌های نکروتروفیک *Alternaria brassicicola* مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات در مورد گیاه کلزا با نتایج قبلی که در مورد گیاه ارابیدوپسیس به دست آمده بود مورد مقایسه قرار گرفتند. جستجو همسانی با استفاده از برچسب توالی بیانی گیاه کلزا از پایگاه داده با حدود ۶۰۰۰ کلون منحصربفرد موجب شناسایی ژن‌های دفاعی در گیاه کلزا شد. ژن‌هایی که در ارتباط با بر همکنش کلزا و بیمارگر شناسایی شدند شامل ژن‌های مربوط به متابولیسم اکسیژن‌های فعال، ژن‌های مقاومت گیاهی، ژن‌های تنظیمی و ژن‌های درگیر در متابولیسم ثانویه بودند (۳۱). Maleck و همکاران در سال ۲۰۰۰ از روش میکروآری برای مقایسهٔ ژن‌هایی که در مسیر SAR در گیاه ارابیدوپسیس شرکت دارند، استفاده نمودند. علاوه بر این، اطلاع از توالی‌های ژنومی این گیاه، آن‌ها قادر به شناسایی پروموتورهای ژن‌هایی کرد که در واکنش SAR بیان شدند. در این مطالعه Maleck و همکاران ار میکروآری استفاده نمود که دارای ۱۰۰۰۰ توالی برچسب بیانی یا ESTs بودند (۳۲).

محدودیت‌های روش ریزآرایه

۱. عدم توانایی در تشخیص ترانسکریپت‌های جدید
۲. محدوده دینامیکی کم برای تشخیص ترانسکریپت ها
۳. مشکلات موجود در تکرار پذیری و مقایسات بین آزمایشات (۳۳).

ب) روش های مبتنی بر PCR

بررسی بیان ژن‌ها نیاز به تعیین دقیق میزان mRNA دارد، اما اساس PCR تکثیر DNA است نه RNA؛ پس چگونه می‌توان از آن برای بررسی mRNA استفاده کرد. برای حل این موضوع ابتدا RNA را، با استفاده از روشی شناختهٔ شده نسخه برداری معکوس، که در حالت طبیعی توسط ویروس‌های RNA دار برای تبدیل RNA ژنومی آنها به DNA در داخل سلول میزبان بکار می‌رود، تبدیل به DNA نموده و سپس، تکثیر PCR بر روی complementary DNA به دست آمده، انجام می گیرد (۳۴). یکی از روش های بررسی بیان ژن‌ها، روش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR) می باشد که در واقع یک روش نیمه کمی برای بررسی میزان بیان یک ژن در یک سلول یا بافت و مقایسه آن با سایر نمونه ها می باشد. برای بررسی بیان ژن از روش های دیگر مانند Real-time PCR نیز استفاده می شود که با توجه به نیاز به دستگاه های خاص و گران قیمت، می توان در بعضی از موارد RT-PCR را جایگزین آن کرد، که البته دقت این روش به مراتب پایین‌تر از روش Real-time PCR است (۳۵).

PCR نیمه کمی

PCR نیمه کمی یا رونویسی معکوس (RT-PCR) قبل از ظهور Real time PCR به عنوان یک روش حساس و اختصاصی مفید برای ردیابی نسخه های RNA با تعداد محدود مرسوم بود. در بیشتر تحقیقاتی که پژوهشگران به دنبال تجزیه وتحلیل RNA هستند، اطلاع از مقدار و کمیت mRNA سلول مورد مطالعه امری گریز ناپذیر است و در این‌صورت تجزیه و تحلیل کیفی RNA کافی نیست (۳۶). در این روش بعد از استخراج RNA، از روی آن cDNA ساخته می‌شود. از آنجا که هدف نهایی انجام این آزمایش تخمین مقدار RNA اولیه است ضرورت دارد تا مقادیر یکسان از RNA برای ساخت cDNA برای همه نمونه ها به کار رود. تقریباً RNA که برای ساخت هر نمونه به کار می رود پنج میکروگرم است. البته با توجه به فراوانی نسخه های mRNA هدف، می توان مقدار بهینه RNA مورد نیاز را با آزمایش مقادیر مختلف RNA اولیه تعیین نمود. cDNAهای ساخته شده برای انجام این واکنش با جفت آغازگرهایی که مربوط به ژن مورد است، انجام می شود (۳۷). اساساً در این روش از ژنی خانه‌دار مانند توبولین و یا اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده می‌شود. پس از اتمام واکنش PCR محصول PCR بر روی ژل آگارز۱/۵ درصد با بافر TBE الکتروفورز می شوند و نهایتاً از این ژل زیر نور UV با استفاده از دستگاه UV-transiluminator عکس گرفته می شود و سپس با استفاده از نرم‌افزارهای پردازش عکس مانند Image J یا TotalLab میزان بیان هر ژن کمی می شود و هر نمونه با توجه به ژن خانه دار خود نسبی می شود و سپس میزان عددی به دست آمده برای هر دو حالت با هم مقایسه می شوند (۲۵).

مزایای روش PCR نیمه کمی

PCR نیمه کمی یا RT-PCR ضمن ارائه یک راه سریع، متنوع و حساس برای بررسی بیان ژن مورد نظر، می‌تواند اطلاعات نیمه کمی نیز دربارهٔ میزان بیان ژن فراهم سازد.

هنگامی که کمبود در مورد امکانات اولیه مانند سلول‌های تمایز یافته اختصاصی وجود دارد می توان از RT-PCR برای تشخیص رونوشت‌های خاص با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، و یا برای ایجاد خزانه های cDNA با استفاده از پرایمرهای عمومی مانند-Oligo dTاستفاده نمود (۲۵).

معایب روش PCR نیمه کمی

به طور نظری RT-PCR باید بتواند یک مولکول mRNA تنها را تشخیص بدهد ولی در عمل این هدف محقق نخواهد شد.

برای به دست آوردن نتایج رضایت بخش باید بهینه سازی در این واکنش صورت بگیرد و نیاز به چندین بار آزمون PCR دارد. با توجه به بهینه سازی گسترده این کار موجب به هدر رفتن مواد و نیز مصرف مقادیر زیادی از آنزیم نسخه بردار معکوس خواهد شد.

در شرایط معمول PCR نیمه کمی فقط می تواند وجود و یا عدم وجود نسخه‌های mRNA را تعیین نماید و اساساً به دلیل فاز سکون انتهایی نمی توان از آن در زمینه اندازه گیری کمی میزان بیان ژن اطلاعاتی ره به دست آورد، اما با وجود ملاحظاتی از آن می توان برای مقایسهٔ تفاوت‌های نسبی مقدار رونوشت‌ها در بین سلول‌های مختلف استفاده نمود (۳۷).

در صورتی می توان به داده‌های حاصل از این روش اعتماد نمود که تعیین میزان محصولات PCR طی فاز تصاعدی و قبل از فاز سکون باشد. با وجود اینکه این روش هیچ مقدار عددیبرای میزان mRNA موجود در نمونه مورد بررسی نمی دهد، ولی می توان با استفاده از آن به راحتی تفاوت مقادیر mRNA را از ۱۰ تا ۲۰ برابر بین نمونه‌های مختلف تعیین نمود (۳۸).

در سال ۱۳۸۴ تحقیقی به وسیلهٔ Talebi و

همکاران با استفاده از روش One step RT – PCR برای شناسایی ویروسBNYVV عامل بیماری ریزومانیا در گیاهان آلوده چغندرقند انجام شد. در این تحقیق مقایسه روش های ELISA وRT-PCR در تشخیص این بیماری نشان داد که روش مولکولی RT- PCR بسیار دقیق تر و سریعتر از روش سرولوژیک ELISA می باشد. ویروس BNYVV عمدتاً محدود به ریشه است و بطور اتفاقی سیستمیک می‌شود، ولی با توجه به حساسیت روش RT- PCR می‌توان از برگ هایی که دارای آلودگی سیستمیک هستند، نیز جهت جداسازی استفاده کرد (۱). در سال ۱۳۹۲ شناسایی و تشخیص ویروس موزاییک معمولی لوبیا و موزاییک نکروتیک معمولی لوبیا با استفاده از روش-Immunocapture RT PCR به وسیلهٔ Salari و همکاران انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که روش IC-RT-PCR برای شناسایی و تشخیص این دو ویروس از حساسیت بالایی نسبت به روش الایزا بر خوردار است. در این تکنیک بکارگیری همزمان و مخلوطی از آنتی سرم اختصاصی ویروس و پرایمر های مربوطه باعث شناسایی و تفکیک همزمان دو ویروس در صورت آلودگی توام خواهد شد (۳۹).

در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای با عنوان استفاده از روش Real time PCR و RT-PCR برای آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در هنگام آلودگی میزبان با قارچ بیمارگر *Aspergillus* انجام شد. در این مطالعه بافت‌های گیاهی و همچنین پستانداران مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد از این دو تکنیک می توان برای شناسایی، پایش بیماری و درمان بیماری های قارچی استفاده نمود (۴۰).

در سال ۲۰۱۲ از RT-PCR در جهت مشخص نمودن تعداد نسخه‌ها و همچنین سطوح بیانی ژن گلیفوزیت اکسیداز سنتزی در گیاه ترانسژنیک کلزا استفاده شد. در این مطالعه یک ساختاری که محتوی نوع جهش یافتهٔ ژن گلیفوزیت اکسیدوردکتازی بود، فراهم شد. تعداد کپی‌های این ژن با استفاده از روش RT-PCR و همچنین روش سادرن بلات تخمین زده شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که این نوع از PCR می‌تواند برای غربال‌گری گیاهان ترانسین مورد استفاده قرار بگیرد (۴۱).

PCR زمان واقعی

Real-time PCR به مفهوم مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند است. مشکلات زیاد موجود در PCR نیمه کمی به همراه نیاز به یک روش تعیین کمی دقیق میزان بیان ژن، زمینه گشایش عرصه ای نوین در روش PCR شد. طرح ابتداییReal-Time PCR ابتدا توسط Higuchiو همکارانش به انجام رسید. در این سیستم تشخیصی یک مادهٔ فلورسانت درطی واکنش متناسب با میزان محصولات هر سیکل آزاد شده و میزان فلورسنت آن توسط یک نمایانگر شناسا یی (Detector) و ثبت می گردد (۴۲). روش Real-time RT-PCR روشی مناسب و دقیق در مطالعهٔ بیان ژن‌ها است. اساس این روش مبتنی بر سنجش کمی نسخه‌های تکثیر شده در مرحلهٔ تصاعدی واکنش PCR، از راه سنجش میزان نور فلورسانس است (۴۳). این روش از زمان معرفی دچار تحولات بسیاری شده، به گونه‌ای که هم اکنون به عنوان یکی از دقیق ترین و سریع‌ترین روش‌های تشخیصی در بسیاری از عرصه‌های علوم به کار گرفته می‌شود. محصول حاصل از این واکنش با استفاده از مواد نشان دار، نشانه‌گذاری می‌شود. در واقع در این روش به جای تعیین محصول با استفاده از روش الکتروفورز، محصول واکنش با استفاده از روش الکتروفورز نشانه‌گذاری و ردیابی می شود. حساسیت این روش نسبت به روش الکتروفورز بالاتر است (۴۴). در این روش محدودهٔ دینامیکی تشخیص افزایش می‌یابد و نیز نیازی به سرعت عمل و تعجیل در انجام فرایندPCR نمی باشد، زیرا در PCR معمولی نمونه‌ها بر روی ژل بلافاصله باید با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی

می‌شوند. این روش قدرت تفکیک پذیری بالای دارد به طوری که قادر به تشخیص تغییرات کمتر از دو برابر نیز می‌باشد، در حالی تفکیک پذیری ژل آگارز بسیار ضعیف می باشد. این روش برای ارزیابی مقادیر دقیقی از DNA و RNA استفاده می شود در ضمن دشواری‌های روش معمولی را ندارد (۴۵).

روش‌های سنجش با Real time PCR

به طورکلی چندین روش برای انجام PCR کمی با استفاده از روش Real time PCR به شرح زیر وجود دارد.

الف) فرم غیر اختصاصی

در این روش با استفاده از عوامل متصل شونده DNA یا DNA- binding agent مانند SYBR green انجام می شود. این رنگ از طریق قرار گرفتن در شکاف کوچک DNA به آن متصل می شود. مزایای این روش شامل ارزان، راحت و حساس بودن آن است، اما یکی از معایب بزرگ آن اتصال SYBR green به دو رشته ای هایی مانند پرایمر دایمر و دیگر باندهای غیراختصاصی است که باعث می‌شود نتایج بیشتر از غلظت اصلی برآورد شود و بنابراین بهینه کردن شرایط واکنش باید به صورتی باشد که پرایمر دایمر و محصول غیراختصاصی به میزان حداقل ایجاد گردد. برای تأیید نتایج این آزمایش از منحنی ذوب استفاده می‌شود (۳۲).

ازجمله مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می شود. دمای ذوبDNA یک پارامتر ویژه برای این مولکول می باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتید، غلظت پروب، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد. از آنجایی که SYBR Greenنمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد می‌توان با استفاده از Melt Curve تنوع محصولات رادر فرآیند PCR مشخص کرد. بعد از اینکه PCRبه پایان رسید دستگاه قادر است نمودار ذوب هر نمونه را رسم کند. این کار بوسیلهٔ اندازه گیری تغییرات فلورسانس در دماهای مختلف صورت می گیرد (۴۶).

ب) فرم اختصاصی

در این مدل از مکانیسم FRET استفاده می شود. در این مکانیسم پروب‌ها طوری طراحی می‌شوند که در ابتدای پروب یک رنگ فلورسانس به نام Reporter و در انتهای آن فلورسانس دیگری به نام Quencher قرار می‌گیرد. وقتی که Reporter وQuencher در فاصلهٔ مولکولی نزدیک به یکدیگر قرار دارند (درحالت اتصال به پروب) نوری که به Reporter می خورد باعث ایجاد یک تابش (Emission) می‌شود که طول موج این تابش در ناحیهٔ تحریک Quencher بوده و Quencher ضمن جذب این نور، تابشی را در طول موج بلندتر ساطع می‌کند که توسط دستگاه قابل ارزیابی نمی‌باشد. پس از جدایی Quencher وReporter نور ساطع شده از Reporter توسط Qencher قابل جذب نبوده و در این حالت دستگاه نور ساطع شده را به صورت فلورسانس اندازه‌گیری می نماید.

در این روش از چندین پروب مختلف می‌توان استفاده نمود که شامل پروب Taq man، پروب Beacons، پروب Scorpion و پروب هیبریداسیون است (۴۷). یکی از مهمترین کاربردهای Real Time PCR تعیین کمی مقدار ژن بیان شده است که به دو روش کمیت سنجی مطلق (Absolute Quantification) و نسبی (Relative Quantification) انجام می‌گیرد (۴۸).

کاربردهای Real Time PCR

بررسی بیان ژن‌ها

با استفاده از این روش می توان اثر یک یا چند دارو را بر روی بیان ژن خاصی مورد مطالعه قرار داد.

با استفاده از این روش می توان عوامل بیماری زای عفونی مانند HIV و HBV را رد یابی و میزان دقیق آن را تشخیص داد.

با استفاده از این روش می توان آلودگی‌های موادغذایی را تشخیص داد.

با استفاده از این روش سرطان هایی مانند سرطان خون و تعیین خطر بازگشت آن مشخص می شود.

در ژن درمانی از این روش استفاده‌های مفیدی می گردد. در این حالت برای تعیین دوز وکتورحاوی ژن مورد نظر در یاCopy Number آن و ارزیابی اینکه وکتور وارد چه سلولها یا بافتی شده است از- Real Time PCR استفاده می شود (۴۹).

با استفاده از این روش می‌توان اختلاف بیان ژن‌های دفاعی گیاهی در شرایط مختلف رشدی و تنشی بین دو یا چند نمونه گیاه بیمار و سالم مورد مشاهده و بازبینی قرار داد (۲۱).

در مطالعه‌ای با استفاده از روش real-time RT-PCR بر اساس پروب اسکورپیون و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده به طور موثری بیماری ویروس برگ بادبزنی انگور یا در حامل نماتد شناسایی شد (۵۰). در بیشتر مطالعاتی که با استفاده از تکنیک Real time PCR صورت می‌گیرد بر اساس دو روش انجام می‌گیرد، اولی بر اساس رنگ فلورسانس SYBR Green و دیگری بر اساس شناساگر TaqMan هستند. این دو روش کمک بسیار زیادی را در شناسایی ویروس‌های گیاهی در میزبان‌های متفاوت نموده‌اند (۵۱). به علت عدم وجود پروتئین در ساختار ویروئیدها که به عنوان یکی از عوامل بیماری زای گیاهی مطرح هستند، استفاده از روش Real time PCR و همچنین RT-PCR به عنوان دو روش بسیار مطمئن برای شناسایی این عوامل بیماری زا مطرح است (۵۲). در سال ۲۰۰۵ از روش Real time PCR بر اساس مادۀ فلورسانت SYBR-Green I برای شناسایی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات و همچنین ویروئید IIb مرکبات استفاده شد (۵۳). کنترل بیماری های گیاهی با عوامل باکتریایی نیاز به روش‌های شناسایی بسیار دقیقی دارد، استتفاده از انواع مختلف Real time PCR باعث تسریع، اختصاصیت و حساسیت بیشتر در شناسایی عوامل باکتریایی گیاهی شده است (۵۹). یک PCR اختصاصی با استفاده از رنگ SYBR Green I برای شناسایی اختصاصی باکتری *Xanthomonas axonopodis* عامل شانکر مرکبات در سال ۲۰۰۴ توسعه داده شد (۵۵).

در مطالعه‌ای دیگر توسط ادهیکاری و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی بیان ۱۴ ژن نامزد در مقاومت به بیماری سوختگی برگ گندم روی ارقام حساس و مقاوم گندم به وسیلۀ روش Real time RT- PCR انجام شد، نشان داد که بیان این ۱۴ ژن در ارقام مقاوم و حساس در نقاط زمانی مختلف، متفاوت است و چهار ژن کیتیناز، فنیل آلانین آمونیالیاز، *PR-1* و پراکسیداز در ۲۴ ساعت اول بعد از آلودگی بیان می‌شوند و تظاهر زود هنگام دارند ولی در دورۀ زمانی ۱۸ تا ۲۴ روز بعد از آلودگی (زمان رشد بیمارگر) همچنان مقاومت توسعه می‌یابد. این نتایج نشان داد که پاسخ مقاومت گندم به قارچ *M. graminicola* طی ۲۴ ساعت اول بعد از آلودگی کامل نمی‌شود و تا ۲۴ روز بعد از آلودگی به ویژه در رقم مقاوم ادامه می‌یابد، بنابراین تجزیه و تحلیل الگوی بیان این ژن‌ها می‌تواند روشی صحیح و سریع برای تفکیک لاین‌ها و ارقام مقاوم از حساس باشد (۵۶).

در سال ۲۰۰۷ Bilodeau و همکاران اثر سه روش شیمیایی مختلف شامل SYBR Green، TaqMan و مولکول‌های beacons را با استفاده از توالی‌های ژن بتا-توبولین، ITS و الیسیتین برای شناسایی *Phytophthora ramorum* عامل مرگ ناگهانی درختان نارون به کار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد هر سه روش می توانند می توانند ایزولۀ ۶۵ از بیمارگر از دیگر گونه های این بیمارگر در همۀ نمونه های آلوده جداسازی نمایند (۵۷).

تحقیقی در سال ۱۳۹۳ به وسیلۀ غلام‌نژاد و

همکاران بر روی الگوی بیانی هشت ژن منتخب در پاتوسیستم گندم و عامل بیمارگر *M. graminicola* با استفاده از روش کمی PCR زمان واقعی انجام شد. این ژن‌ها شامل ژن‌های رمز کنندهٔ گلوکاناز، P450، لیپوکسیژناز، PR3، چالکون سنتاز، NBS LRR، ABC transporter بودند و از ژن خانه‌دار (House keeping)، Translation Elongation factor (Tef1α) به عنوان مرجع استفاده شد. نتایج نشان داد بیان این هشت ژن در نقاط زمانی مختلف نشان داد که این ژن‌ها در زمان‌های مختلف و همچنین تحت تیمارهای مختلف تغییرات بیان نشان دادند (۵۸).

ج) روش‌های متکی بر توالی یابی

اگرچه ریزآرایه‌ها، یکی از اولین ابزارهای دارای توان بالا برای بررسی ترانسکریپتوم ها در طول دو دهه گذشته بوده اما این روش همانطور که قبلاً ذکر شد دارای محدودیت‌های فراوان بود (۵۹).

در مقایسه با روش‌های ریزآرایه، روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی، بطور مستقیم توالی cDNA را تعیین می‌کنند. در ابتدا روش‌های توالی یابیcDNA سنگر استفاده می شد (۶۰). اما این روش دارای توان عملیاتی کم (Low Throughput)، هزینه زیاد و بطور کلی مقرون به صرفه نبودند. روش‌های دیگر که مبتنی بر توالی‌های نشانه یا Tag بودند، برای غلبه بر این محدودیت‌ها گسترش یافتند که از جمله این روش‌ها می توان به آنالیز سریالی بیان ژن‌ها (SAGE) آنالیز cap بیان ژن (Kodzius etal, 2006) (CAGE) و روش MPSS (۶۱) اشاره نمود. از مزایای این سه روش ذکر شده این است که توان عملیاتی بالایی دارند و می توانند به طور دقیقی سطوح بیان ژن را تعیین نمایند، اما در اکثر این روش‌ها بخشی از ترانسکریپت ها آنالیز می شوند و ایزوفرم ها از یکدیگر قابل تشخیص نیستند این معایب باعث محدود شدن استفاده از تکنولوژی های توالی یابی مرسوم در بررسی ساختار ترانسکریپتوم ها شده است. اخیراً و با گسترش توالی یابی نسل بعد، محققان روش جدیدی را برای آنالیز و نقشه یابی و ترانسکریپتومها ایجاد نموده اند. این روش، توالی یابی RNA یا RNA-Seq نامیده شده که دارای مزایای بیشتری نسبت به روش‌های مرسوم، بخصوص در ترانسکریپتوم های یوکاریوت است (۶۲).

روش RNA-Seq در سال ۲۰۰۸ توسعه یافت و اولین بار برای آنالیز ترانسکریپتوم های مخمر، موش، انسان و آرابیدوپسیس استفاده شد (۶۳). در ادامه به تعدای از این روش‌ها اشاره می‌شود.

تجزیه و تحلیل سریالی بیان ژن (SAGE)

روش بررسی سریالی بیان ژن (Serial analysis of gene experession) SAGE برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط دکترولکولسکو همکارانش در دانشگاه جان هاپکینز آمریکا بکار گرفته شد. این روش نه تنها برای تولید پروفایل‌های بیان ژن برای یک سلول یا بافت خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد، بلکه برای شناسایی ژن‌های ویژه‌ای که در شرایط خاص سلولی بیان می‌گردند نیز به‌کار گرفته می‌شود. SAGE همچنین بطور گسترده در مطالعه میکروارگانیسم‌ها، سرطان و تکامل مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش SAGE بر اساس سه اصل مهم بنا نهاده شده است (۶۴). اولین اصل استفاده از توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی کوتاه (tag) درحدود ۱۰ الی ۲۷ جفت باز می‌باشد که از بخش مشخصی ازcDNA مشتق شده و برای شناسایی منحصر به فرد یک رونوشتmRNA کافی است. اصل دوم اتصال پشت سرهم توالی‌های tag می باشد که اجازهٔ آنالیز سریالی رونوشت‌ها را فراهم می‌نماید. حدودtag ۲۵ الی ۵۰ به هم متصل شده و در ساختار یک وکتور قرار می‌گیرند و سپس به‌صورت خودکار تعیین توالی می شوند. در نتیجه، با انجام یک واکنش تعیین توالی، اطلاعات برای بیش از ۳۰-۳۵ ژن مختلف بدست خواهد آمد. سومین

اصل بیانگر آن است که تعداد دفعاتی که یک tag ویژه مشاهده می‌گردد، دقیقاً نشان دهنده سطح بیان رونوشت های مرتبط با آن می‌باشد. در این روش به جای مطالعهcDNA کامل یک توالی کوتاه ۱۲ جفت بازی را فراهم می‌شود که هر کدام از این توالی های ۱۲ نوکلئوتیدی نماینده یک mRNA در ترانسکریپتوم می‌باشد. اساس این روش همین توالی‌های ۱۲ جفت بازی است که با وجود اندازه کوچکشان برای شناسایی ژن‌های رمز دهنده mRNA کافی هستند (۶۵). اولین مرحله برای ایجاد توالی‌های ۱۲ جفت بازی، تثبیت mRNA درون یک ستون کروماتوگرافی با اتصال دم پلی A موجود در انتهای '۳ مولکول‌ها به ریزدانه های سلولزی است. در مرحلهٔ بعد mRNA بهcDNA دو رشته ای تبدیل و سپس با آنزیم محدود کننده دارای جایگاه شناسایی چهار تایی مانند AluI تیمار می شود تا cDNA در جایگاه‌های زیادی بریده شود. قطعات محدود کننده انتهایی به ریزدانه های سلولزی متصل باقی می مانند و سایر قطعات را می توان شست تا از ستون خارج شوند (۶۶). سپس یک اتصال دهنده کوتاه به انتهای آزاد هر cDNA متصل می‌شود. این اتصال دهنده دارای جایگاه شناسایی آنزیم BsmEI است. این آنزیم یک آنزیم محدود کننده منحصر به فرد است که علاوه بر برش جایگاه شناسایی خود، در فاصله ۱۰ الی ۱۴ نوکلئوتید، فرودست محل شناسایی خود را نیز برش می‌دهد؛ بنابراین تیمار باBsmEI قطعاتی با میانگین طول ۱۲ جفت باز را از انتهای هر cDNA جدا می‌کند. این قطعات جمع آوری شده و به صورت سر به دم به صورت یک زنجیر به هم متصل شده و تعیین توالی می گردد و توالیهای جداگانه در زنجیر قابل شناسایی هستند؛ زیرا با جایگاهایBsmEI از هم جدا می شوند. در واقع در پایان واکنش SAGE پلیمری از Tag ها و شناسه‌های نوکلئوتیدی که به صورت پیاپی به هم متصل شده اند تشکیل می‌گردد و از طریق تعیین محل آنزیمی که آن‌ها برش زده است قابل تفکیک از هم هستند. تجزیه و تحلیل توالی حاصل توسط نرم‌افزارها به فهرستی از شناسه های ژن‌های بیان شده در سلول یا بافت مورد مطالعه منتهی می گردد که فراوانی آن‌ها تخمینی از میزان بیان آن‌ها خواهد بود. هم اکنون حجم زیادی از اطلاعات پروژه های SAGE در پایگاه‌های اطلاعاتی وجود دارد (۶۷).

مزایای روش SAGE

روش SAGE اجازهٔ آنالیز وسیع رونوشت های mRNAرا بدون داشتن دانش اولیه در مورد ترانسکریپتوم ارگانیسم فراهم می‌نماید.

توالی هر tag برای جستجوی آن در پایگاه اطلاعاتی کافی است و فراوانی هرtag مستقیماً نشان دهنده فراوانی رونوشت مربوطه می‌باشد (۶۸).

کاربردهای SAGE درمطالعات گیاهی

ازجمله کاربردهای رایج SAGE در مطالعات گیاهی می‌توان به مطالعه برهمکنش میزبان با پاتوژن، بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی، مطالعهٔ متابولیسم مواد سمی و بررسی پروفایل‌های بیانی بافت یا ارگان بخصوص اشاره نمود. هرچند اغلب این بررسی‌ها بر روی مدلهای گیاهی برنج و آرابیدوپسیس صورت گرفته است ولی استفاده ازروش SAGE در مطالعه سایر گیاهان نیز روز به روز در حال گسترش است (۶۹).

در سال ۲۰۰۳ مطالعه‌ای با عنوان آنالیز بیان ژن‌ها در برهمکنش میزبان گیاهی و بیمارگر با استفاده از روش SuperSAGE انجام گرفت. در این مطالعه با استفاده از این روش، پروفایل بیان ژنی در هر دو موجود برنج و قارچ بیمارگر به صورت همزمان بررسی شد. با استفاده از این روش، ژن‌هایی که در این برهمکنش در پاسخ به الیسیتور بیمارگر مقدار بیان آن‌ها زیاد و کم شد، شناسایی شدند. بررسی‌ها نشان

دادند که تعداد زیادی از ژن‌هایی که میزان بیان آن‌ها کاهش پیدا می‌کند مربوط به پروتئین‌هایی هستند که در فرایند فتوسنتز نقش دارند. این بررسی نشان داد که SuperSAGE یک روش بسیار مفید برای بررسی ترانسکریپتوم سلول در برهمکنش میزبان و بیمارگر، مخصوصاً در مورد موجوداتی که هیچ اطلاعاتی در مورد ژنوم آن‌ها نیست، است (۶۸).

روش MPSS

روش Massively parallel signature sequencing (MPSS) روش دیگری است که برای تعیین میزان کمی نسخه های mRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد، از نظر نتایج مانند روش SAGE است، و تفاوت آن با روش SAGE به کارگیری یکسری مراحل بیوشیمیایی و توالی یابی متفاوت است. این روش، روشی با انتهای باز است که سطوح بیانی همهٔ ژن‌ها را در یک نمونه به وسیلهٔ شمارش تعداد مولکول‌های منحصربفرد mRNA که به وسیلهٔ هر ژن تولید می شود، آنالیز می کند. در این روش نیاز به آماده سازی ژن‌هایی که قرار است مورد بررسی قرار بگیرند، نیست. در روش MPSS مقدار بسیار کم مولکول ها mRNA نیز قابل بررسی هستند، و داده های خروجی آن نیز به صورت دیجیتال هستند در نتیجه کار با آن‌ها آسان می باشد. بنابراین اخیراً تکنولوژی‌های بسیاری بر پایهٔ میکروآری و غیر میکروآری وجود دارد، و این روش کمک بسیار زیادی به آزمایشاتی که در زمینهٔ زیست شناسی دیجیتال انجام می‌شود خواهد کرد. این تکنولوژی در مورد برهمکنش بیمارگر و گیاه زیاد مورد استفاده قرار نگرفته است، اما برای پایش تنظیمنسخه‌برداری در گیاه زیاد مورد مطالعه قرار گرفته است. در مورد بیمارگرهای یوکاریوتیک مانند قارچها، اامیست‌ها و یا حیوانات خسارت زننده این روش می تواند جهت پایش وقایع نسخه‌برداری به طور همزمان با میزبان مورد استفاده قرار بگیرد (۶۹).

روش توالی یابی RNA

جدیدترین و کارآمدترین ابزار برای بررسی رونوشت‌ها، روشهای توالی‌یابی با توان بالا برای توالی‌یابی cDNA می‌باشند، این تکنولوژی توالی‌یابی شاتگان ترنسکریپتوم و یا RNA-seq نامیده می‌شود. روش RNA-seq قادر به شناسایی ایزوفرم‌های ژن، واریانتهای ژن (شامل انواعSNP ها و SSRsها)، تغییرات جابجایی و تغییرات پس از رونویسی می‌باشد (۱۶). یکی از مهمترین اهداف آزمایشات RNA-seq تشخیص تغییرات بیان ژن‌ها در دو یا چند شرایط متفاوت می‌باشد. سطح بیان هر RNA توسط اندازه‌گیری تعداد قطعات توالی‌یابی شده برای هر رونوشت خاص تعیین می‌شود (۷۰).

RNA-seq به عنوان روشی موثر برای مقایسه بیان RNA در شرایط تنش و غیرتنش در گیاهان مختلف از جمله ذرت، آربیدوپسیس، هلو، برنج و گیاهان بسیار دیگری استفاده شده است (۷۱)، که نشان‌دهندهٔ اهمیت و کارایی این روش در بررسی پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی است. در سال ۲۰۱۰ با استفاده از روش‌های توالی‌یابی mRNA برنج تحت شرایط تنش شوری ۲۱۳ ژن تغییر بیان یافته در ساقه و ۴۱۹ ژن تغییر بیان یافته در ریشه شناسایی شدند (۷۲). برای این ۶۳۲ ژن هیچ‌گونه تفسیری در بانک‌های اطلاعاتی گزارش نشده بود، تنها در بعضی از آن‌ها، پروتئین‌های فرضی را کد می‌کنند، که در پاسخ به شوری تفاوت بیان نشان می‌دهند. در سال ۲۰۱۲ Kakumanu و همکاران ترنسکریپتوم ذرت را با استفاده از روش RNA- seq تحت شرایط کنترل و خشکی بررسی کردند (۷۳)، این گروه گزارش کردند که تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با متابولیسم کربوهیدرات و ژن‌های مرتبط با متابولیسم ساکارز و نشاسته در بافت تخمدان اتفاق می‌افتد، که با کاهش میزان نشاسته و فعالیت انتقال ساکارز همراه بوده

است، در حالی که در مریســتم برگ چنین تغییراتی مشاهده نشد. همچنین گزارش شد که شروع فرایندهای وابسته به اسیدآبسزیک تنها در بافت تخمدان اتفاق می‌افتد (۷۳).

پیشرفت‌های اخیر در توالی یابی نسل بعد باعث شده که بازه پوشش توالی یابی نوکلئوتید هایDNA و همچنین مقدار نمونه ورودی برای توالی یابی افزایش پیدا کند. این پیشرفت‌ها، توالی یابی رونوشت‌های RNAسلول را تسهیل و این امکان را به‌وجود می‌آورد که رونوشت‌های پیرایش شده (Spliced) ژن، تغییرات پس از رونویسی، همجوشی ژن‌ها (Gene fusion)، جهش‌ها و پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single-nucleotide polymorphism) و در نهایت تغییرات در بیان ژن را بررسی کنیم (۷۳).

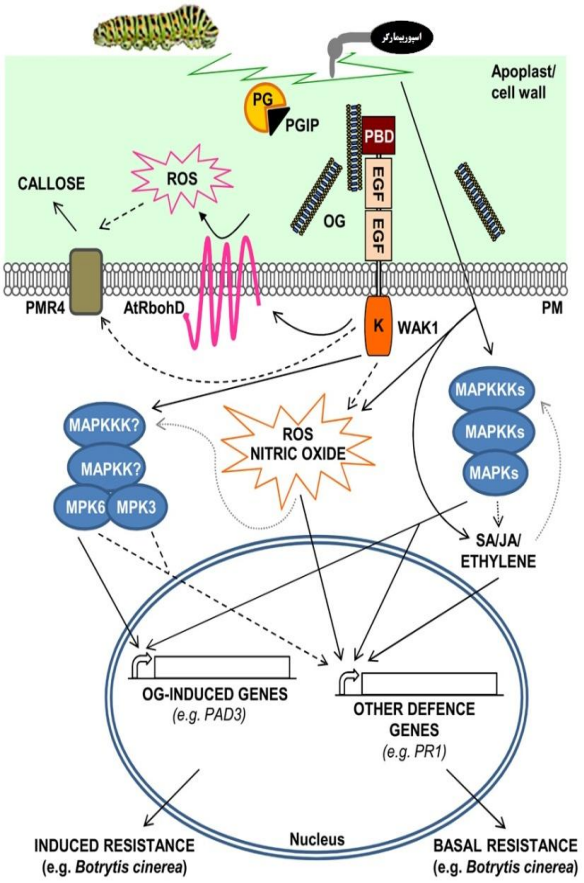
در سال ۲۰۱۲، پژوهشی با عنوان RNA-seq دوگانه در برهمکنش بیمارگر و میزبان به وسیلهٔ Westermann و همکاران انجام شد. در این تحقیق Westermann و همکاران امکان بررسی ترانسکریپتوم را با انجام RNA-seq دوگانه بررسی کردند. نتایج نشان داد با انجام این روش امکان بررسی همزمان بیان ژنها در میزبان و بیمارگر گیاهی وجود داشت (۵۶). در سال ۲۰۱۳ تحقیقی به وسیلهٔ Gao و همکاران با عنوان واکنش های دفاعی اختصاصی بیمارگر به وسیلهٔ روش آنالیز توالی RNA در غدهٔ سیب زمینی در برهمکنش با بیمارگر Phytophthora infestans انجام شد. Gao با استفاده از روش توالی یابی RNA، ترانسکریپت‌های سیب زمینی تتراپلوئید را مورد بررسی و در حدود ۳۰۰۰۰ ژن را در سیب زمینی مورد شناسایی قرار داد. بررسی بیان افتراقی ژن‌ها با استفاده از این روش باعث گروه‌بندی ژن‌ها و همچنین نمایاندن اختلاف بین ارقام مقاوم و حساس شد. همچنین نسخه هایی از ژن‌های گندم که رمزکنندهٔ افکتورها بود مورد شناسایی قرار گرفت (۷۴).

اهمیت و نمونه هایی از بررسی بیان ژن‌های دفاعی گیاهی

بررسی بیان ژن‌ها در زمان تنش و شناسایی ژن‌های دفاعی نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرها را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می سازد. تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی توسط مولکول‌هایی مانند اتیلن، اسیدسالیسیلیک و فیتوآلکسین‌ها صورت می‌گیرد، این ترکیبات باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه و همچنین افزایش استحکام دیوارهٔ سلولی و افزایش تشکیل لیگنین می‌شوند. این پاسخ‌ها مجموعاً منجر به ایجاد و یا افزایش سطح مقاومت به قارچ‌های بیماری زا می‌شود. بیان این پروتئین‌ها توسط عوامل رونویسی خاص تنظیم می‌شود. عوامل رونویسی از اجزای مهم و کلیدی در کنترل بیان ژن در همهٔ بافت‌های زنده هستند و باعث تنوع فنوتیپی و سازگاری موجودات در طی تکامل می شود (۷۵). حدود ۱۳۰۰ الی ۱۵۰۰ عامل رونویسی در گیاهان شناسایی شده است که بعضی از آن‌ها در پاسخ به تنش‌ها اعم از تنش‌های زیستی مانند بیمارگرها و تنش‌های غیرزیستی مانند گرما، سرما و همچنین نورزیاد یا کم، نقش دارند. از میان عوامل رونویسی مختلف پروتئین‌های AP2 Domain، WEKY، MYB و HD-ZIP بارزترین نقش را در پاسخ به تنش‌ها دارند (۷۶). در شکل ۱ نحوهٔ تأثیر بیمارگر بر گیاه و نمایی از برهمکنش‌های سلولی و متعاقب آن بیان ژن‌های مرتبط نمایش داده شده است. روش‌های مختلفی جهت تجزیه پروفایل بیان ژن در گیاهان از جمله گندم وجود دارد. نوردرن بلات معکوس[1] یکی از معمولترین این روش‌هاست که به عنوان رابط اطلاعات توالی (ژنومیکس ساختاری) را به

1. Reverse Northern blot

ژنومیکس عملکردی (تعیین عملکرد و نوع فعالیت) ارتباط می‌دهد. میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاه به عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی SAR در گیاهان مختلف و علیه بسیاری از بیمارگرها انجام شده است. نتایج بررسی بر روی گیاه برنج نشان می‌دهد که بیان یکی از ژن‌های رمز کنندهٔ لیپوکسیژناز به نام *RCI 1*[1] در برنج، در اثر کاربرد موادشیمیایی فعال کنندهٔ سیستم دفاعی نظیر BTH[2] و پروبنازول افزایش می‌یابد و باعث افزایش مقاومت گیاه برنج در برابر بعضی عوامل بیماری‌زا می‌شود. همچنین بیان ژن دفاعی RPR1[3] در اثر تیمار برنج با پروبتازول گزارش شده است (۷۷). در گیاهان محصولات ژن‌های مقاومت به بیماری اغلب، محصولات بیمارگرهای خاصی را که ژن *Avr* مربوطه را بیان می کنند، تشخیص می‌دهند. بیش از ۲۰ ژن مقاومت از گونه‌های گیاهی شامل تک لپه‌ای‌ها و همچنین دولپه‌ای‌ها با اختصاصیت در تشخیص برای ژن‌های *Avr* معین جداسازی شده است. ژن‌های مقاومت پروتئین‌های مخصوص با موتیف‌های مشترک را رمز می‌کنند. همچنین پنج دسته از ژن‌های مقاومت (R) با دومین‌های مختلف تاکنون تشخیص داده شده‌اند که عبارتند از: پروتئین‌های کینازی شبه رسپتوری با یک دومین LRR[4] خارج سلولی، پروتئین‌های LRR درون سلولی با یک دومین NBS[5] و یک موتیف LZ، پروتئین‌های TIR[6] و پروتئین‌های LRR که پروتئین‌های خارج سلولی متصل به غشا را رمز می‌کنند (۷۸).



شکل ۱- نمایی از برهمکنش بیمارگر وگیاه و فعال شدن مسیرهای متابولیسمی و ژن‌های دفاعی

اغلب پروتئین‌های مقاومت که باعث مقاومت به ویروس‌ها و سایر بیمارگرها می‌شوند در گروه‌های خاصی از دسته‌های پروتئینی قرار می گیرند که دارای دامنهٔ NBS-LRR هستند. ژن‌های مقاومت دارای دومین NBS-LRR در تشخیص بیمارگر و شروع بعدی پاسخ‌های دفاعی وارد عمل می‌شوند. دومن NBS از موتیف‌های P-Loop، Kinase-2، Kinase-3a و GLPL (Gly-Leu-pro-Leu) تشکیل شده که برای فعالیت هیدرولیز و اتصال GTP یا ATP بسیار حفاظت شده‌اند، در حالی‌که تصور می‌شود دومین انتهایی C، LRR باعث ایجاد فعالیت تشخیصی در امر مقاومت گیاه می‌شود (۷۹).

مطالعات انجام شده به وسیلهٔ ادهیکاری و همکاران در سال ۲۰۰۷ جهت شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد

1. Rice Chemically Induced cDNA
2. benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester
3. Rice Probendazole Responsive
4. Leucine Rich Repeat
5. Nucleotide Binding Site
6. Toll/interleukin receptor

مقاومت به بیماری سوختگی برگ گندم از طریق روش cDNA-AFLP[1] نشان داده است که در طول پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری علاوه بر مقاومت تک ژنی، تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها نیز افزایش می‌یابد (۶۱).

تحقیقی در سال ۱۳۹۱ توسط Habibi و همکاران الگوی بیان پنج ژن مرتبط با دفاع شامل PR-1، کیتیناز، پراکسیداز، PR-5 و پروتئین‌های بازدارندهٔ آنزیم پروتئاز بررسی و سطح بیان این پنج ژن در هشت زمان (صفر تا شش روز) بعد از آلودگی در رقم مقاوم ونگشوبای و رقم حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های مورد بررسی در اثر آلودگی با بیمارگرهای گندم، فوزاریوم، بازدگی و زنگ نواری گندم در هر دو رقم حساس و مقاوم تغییر پیدا می‌کند. بررسی روند تغییرات بیان این ژن‌ها در طی دورهٔ شش روزه پس از آلودگی نشان دهندهٔ افزایش سریع‌تر بیان آن‌ها در رقم مقاوم ونگشوبای نسبت به رقم فلات بود (۷۸). Esllahi و همکاران در سال ۱۳۹۱ القا متمایز ژن‌ها در دو رقم گندم چمران و مرودشت در پاسخ به بیمارگر M.graminicola به وسیلهٔ آنالیز cDNA-AFLP را بررسی نمودند. بیان ژن‌ها در این بررسی در شش نقطهٔ زمانی (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) بعد از تلقیح مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی نشان داده شد بیان هشت ژن مرتبط با بیماری‌زایی، ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از تلقیح القا می شوند، و بیان سایر ژن‌ها در دیگر زمان‌های القا شونده است (۸۱).

در سال ۲۰۱۲ تحقیقی جهت شناسایی ژن‌های دفاعی در گیاه گندم در برهمکنش با بیمارگر M. graminicola، با روش (cDNA AFLP) در ارقام مقاوم فرونتانا و حساس سری ۸۲، توسط Sedaghatfar و همکاران انجام شد. الگوی قطعات مشتق شده از رونوشت‌ها (TDFs) در رقم مقاوم مورد مطالعه، فرونتانا، با رقم حساس، سری ۸۲، و کنترل های مربوطه، مقایسه شد. نمونه‌برداری‌ها در نه نقطهٔ زمانی از ساعت صفر تا ۲۴ روز بعد از آلودگی صورت گرفت. رونوشت‌هایی از رقم مقاوم فرونتانا که بیان آن‌ها بعد از تلقیح افزایش یافته بود (۱۷۰ عدد)، جدا، بازیابی، همسانه‌سازی، توالی‌یابی سپس BLAST شدند. در مجموع ۴۷ قطعه از TDFs شباهت پروتئینی قابل توجهی با پروتئین‌های شناخته شده در مجموعهٔ NCBI نشان دادند. سپس پروفایل بیانی نه ژن به وسیلهٔ Real Time- PCR بررسی شد. این ژن‌ها شامل دامنه PCI، پروتئین تیروزین کیناز ZF- HD[2]، تکرارهای پروتئین کیناز شبه گیرنده غنی از لوسین، دومین WD40، دومین کیناز کاتالیزوری دی‌آسیل‌گلیسرول و ژرانیل ترانسفراز نوع II، ATPase های مرتبط با طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سلولی و FKBP prolyl نوع پپتیدیل سیس ترانس ایزومراز بودند. سپس عملکرد این ژن‌ها در ارتباط با پاسخ دفاعی در برابر بیمارگر بررسی شد (۸۲).

1. Amplified fragment length polymorphism

2. Zinc-Finger-Homeo Domain protein dimerization region

منابع و مآخذ

1. Taft, R., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S. Non-coding RNAs: regulators of disease. Journal of Pathology, 2010; 220:126-139.
2. Talebi, A.B.J., Hashemi sohi, H., Maleki, M. Detection of BNYVV by one stepRT-PCR in infected sugar beet. The 4th National Biotechnology congress. 2005; 5(8): 112-120.
3. Anderson, P., Kedersha, N. RNA granules post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009; 10: 430-436.
4. Weber ,C., Nover, L., Fauth, M. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. Plant Journal 2008; 56: 517-530.
5. Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Cur. Opin. Plant Biol. 2000; 3, 278-284.
6. Singh, K., Dennis, E. S., Ellis, J. G., Llewellyn, D. J., Tokuhisa, J. G., Wahleithner, J.A., Peacock, W,J. OCSBF-1, a maize ocs enhancer binding factor: isolation and expression during development. Plant Cell, 1990; 2: 891–903.
7. Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Cur. Opi. in P. Bio., 1999; 2: 280-286.
8. Bolwell, GP. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. Cur. Opi. in Plant Bio. 1999; 2: 287-294.
9. Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E. Functional analysis of regulatory sequences controllingPR-1 gene expression in Arabidopsis. Plant J., 1998; 16: 223-233.
10. Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M., Dong, X. Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in Arabidopsis. Plant Cell, 2000; 12:2175-2190
11. Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., and Shinozaki, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought-and abscisic acid-regulated gene expression. 1997; The Plant Cell, 9: 1859–1868.
12. Chen, H. and Vierling, R.A. Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families. Plant Science, 2000; 150, 129–137.
13. Chen, S., Vaghchhipawala, Z., Li, W. and Asard, H. Dickman, MB. Tomato phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits cell death induced by bax and oxidative stresses in yeast and plants. Plant Physi. 2004; 135, 1630–1641.
14. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes" 1997.
15. Wang, Z., Yang, B. Northern Blotting and Its Variants for Detecting Expression and Analyzing Tissue Distribution of miRNAs. MicroRNA Expression Detection Methods. 2009; Pp: 83-100.
16. Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiology, 2003; 133: 1755-1767.
17. Krumlauf, R. Analysis of gene expression by northern blot. Mol Biotechnol. 1994; 2(3):227-42.
18. Gan, Y., Zhou, Zh., Ana, L., Baoa, Sh., Fordeb, B.G. A Comparison Between Northern Blotting and Quantitative Real-Time PCR as a Means of Detecting the Nutritional Regulation of Genes Expressed in Roots of Arabidopsis thaliana. Agricultural Sciences in China. 2011; 10(3): 335–342.

19. Navabpoor, S., Baghericeh, M., Hadad, R. Comparison of Induced Gene Response toStressful Treatment in Sp inacia oler acea and Br assica nap us. Biotech. in Agicul. 2011; 10(1): 1-10.

20. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi Kh. Effect of salicylic acid on disease development and induced defense genes expression in wheat after infection with *Mycosphaerella graminicola*. Ph D Thesis, Plant department, Agriculture faculty, TMU. 2014.

21. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi Kh. Evaluation of housekeeping gene expression of wheat interaction against *Mycosphaerella graminicola* with Reverse northern dot blot method. Crop Biotechnology. 2016a; 12:1-10. (In Farsi).

22. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi Kh. Study of changes in change of gene expression of the coding Heat shok proteins (Hsp70 and Hsp90) in response to *Mycosphaerella graminicola* on wheat. 5th National congress on Agriculture, Aquatic Animals and food, Bousher, Iran. 2016b; (In Farsi).

23. Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi Kh. Study of changes in change of gene expression of the coding Ethylene insensitive 3 protein in response to *Mycosphaerella graminicola* on wheat. 2th International and 14th Iranian Genetics Congress, Tehran, Iran. 2016c; (In Farsi).

24. Rey, J.M., Pujol, P., Callier, P., Cavailles, V., Freiss, G. and Maudelonde, T. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. J. Mol. Endocrinol. 2000; 24(3):433-40.

25. Maskos, U. and Southern, E.M. Oligonucleotide hybridizations on glass supports-a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ. Nucleic Acids Res. 1992; 20:1679-1684.

26. Li, J., Mookerjee, B., Singh, P. and Wagner, J.L. Generation of BKV-Specifi c T Cells for Adoptive Therapy Against BKV Nephropathy. Virology: Research and Treatment. 2008; 1: 97–107.

27. Duan, S.H., Mathews, D.H. and Turner, D.H. Interpreting oligonucleotide microarray data to determine RNA secondary structure: Application to the 3′ end of Bombyx mori R2 RNA. Bioche. 2006; 45:9819-9832.

28. Kierzek E., Barciszewska M.Z., Barciszewski J. Isoenergetic microarray mapping reveals differences in structure between $tRNA_i^{Met}$ and $tRNA_m^{Met}$ from Lupinus luteus. Nucleic Acids Symp. Ser. 2008; 52:215-216.

29. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. J. Mol. Biol. 1975; 98:503-511.

30. Makkouk, K. and Kumari, S. (2006). Molecular Diagnosis of Plant Viruses. Arab J. of Plant Prot. 2006; 24(2): 135-138.

31. Pauerstein P. 2011. RNA-Seq: Current Methods and Potential Applications. Comput. Mol. Bio. 2011; 5: 220- 225.

32. Primrose SB, Twyman RM, Old RW. Principles of Gne Manipulation،6th edn. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 2011.

33. Varallyay,E., Burgyan,J. and Havelda, Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. Nat. Protoc., 2008; 3, 190–196.

34. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 2(8): 86-8,96.

35. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J. Biochem. Biophys. Methods. 46: 69-81. J. Biochem. Biophys. Methods. 2000; 46: 69-81.

36. Ullmann S, Schroder SS, Fisch E. Improvements in quantitative real-time RT-PCR with qiagen, omniscript and sensiscript Rts. 2001; 2: 13-16.

37. Visser J, Graffelman W, Blauw B. LPS-incubated IL-10 production in whole blood cultures from chronic fatigue syndrome patients is increased but supersensitive to inhibition by dexamethasone. J Neurimmunol. 2001; 119(2): 43-349.

38. Breljak D, Ambriović-Ristov A, Kapitanović S, Čačev T, Gabrilovac J. Comparison of three RT-PCR based methods for relative quantification of mRNA. Food Technol Biotechnol; 2005; 43(4):379-

39. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. Biol Proced Online 2001; 3:19-25.

40. Salari N, Seyed Musavi M, Shahraeen N, Ghobani Sh , Maleki m. Identification and diagnosis of isolates of bean common mosaic viruses and bean common mosaic necrosis viruses by immunocapture RT-PCR. New cell. and Mol. Biotech. Of Journal. 2013**;** 3(11): 21-28.

41. Bok JW, Keller NP, Tsitsigiannis DI (2009) Real-time and semiquantitative RT-PCR methods to analyze gene expression patterns during Aspergillus-host interactions. Methods Mol Biol. 2009; 470:151-67.

42. Hadi F., Salmanian A.H., Mousavi A., Ghazizadeh E., Amani J., Akbari Noghabi K. 2012. Development of quantitative competitive PCR for determination of copy number and expression level of the synthetic glyphosate oxidoreductase gene in transgenic canola plants. Electronic Journal of Biotechnology. 2012; 15(4).

43. Livak, K.L., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ T. METHODS, 2001; 25: 402–408.

44. Wang, S.M. Understanding SAGE data. TRENDS in Genetics. 2007; 23:42-50.

45. Garrido C., Acero F.G.F., Carbu M., Rodriguez V.E.G., Liniero E., Cantoral J.M. Molecular microbiology applied to the study of phytopathogenic fungi. In: Magdeldin S. (ed.): Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Rijeka, InTech: 2012; 139–156.

46. Capote, N., Pastrana, A.M., Aguado, A. and Torres, P.S. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Cumagun C.J. (ed.): Agricultural and Biological Sciences "Plant Pathology". Rijeka, InTech: 2012; 151–202.

47. Chilvers MI. Molecular Diagnostics in Plant Disease Diagnostic Clinics… What's the Status? Fungal Genome Biol. (2012); 2:e102.

48. Didenko. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. Biotechniques. 2001; 31(5): 1106–1121.

49. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, 2006; 19: 165–256.

50. Kornberg, A., Baker, T. A., DNA Replication. (2nd ed.) pp 15, W. H. Freeman & Co. (1992)

51. Paplomatas EJ. Molecular Diagnostics of Fungal Pathogens. Arab J. of Plant Prot. 2006; 24(2): 158-147.

52. Finetti-Sialer MM, Ciancio A. Isolate-specific detection of Grapevine fanleaf virus from Xiphinema index through DNA-based molecular probes. Phytopathology, 2005; 95: 262–268.

53. Yang JG, Wang FL, Chen DX, Shen LL, Qian YM, Liang ZY, Zhou WC, Yan TH. Development of a one-step immunocapture real-time RT-PCR assay for detection of Tobacco mosaic virus in soil. Sensors, 2012; 12: 16685–16694.

54. Boonham N, Perez LG, Mendez MS, Peralta EL, Blockley A, Walsh K, Barker I, Mumford RA. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. J of Virol. Methods, 2004; 116: 139–146.

55. Tessitori M, Rizza S, Reina A, Catara V. Real-time RT-PCR based on Sybr-Green I for the detection of citrus exocortis and citrus cachexia disease. In: Hilf M.E., Duran-Vila N., Rocha-Peña M.A. (eds): Proceedings 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Nov 3–6, 2004. Riverside, USA: 2005; 456–459.

56. Mavrodieva V., Levy L., Gabriel D.W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathol., 2004; 94: 61–68.

57. Adhikari TB, Balaji B, Breeden J and Goodwin, S.B. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involve early and late peaks of gene expression. Physio. and Mol. Plant Path. 2007;71: 55-68.

58. Bilodeau G.J., Levesque C.A., Decock A.W.A.M., Duchaine C., Briere S., Uribe P., Martin F.N., Hamelin R.C. Molecular detection of Phytophthora ramorum by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and Molecular beacons. Phytopath. 2007; 97: 632–642.

59. Li, Q., Birkbak, N.J., Gyorffy, B., Szallasi, Z. and Eklund, A.C. selecting the optimal microarray probe set to represent a gene. *BMC Bioinformatics*, 2011; **12**:474.

60. Gerhard, D.S., Wagner, L., Feingold, E.A., Shenmen ,C.M., Grouse, et al. The status, quality, and expansion of the NIH Full-Length cDNA Project: The Mammalian Gene Collection (MGC). Genome Res. 2004; 14:2121–2127.

61. Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L. and Quake, S.R. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2008; 105: 16266-16271.

62. Grabher MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson, DA, AMIT I, Adiconis X, Fan L., Raychowdhury R, Zeng Q. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology, 2011; 29:644-652.

63. Hua R, Barrett AN, Tan TZ, Huang Z, Mahyuddin AP, Ponnusamy S, Sandhu JS, Ho SS, Chan JK, Chong S, Quan S,Choolani M. Detection of aneuploidy from single fetal nucleated red blood cells using whole genome sequencing. Prenatal Diagnosis. 2014; 34:1-8.

64. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome Res, 18(9):1509-17. doi: 10.1101/gr.079558.108. Epub 2008 Jun 11.

65. Nistico A , Young NS. Gamma- interferon gene expression in the bone marrow of patient with aplastic anemia , 1994; Mar: 120: 463-469.

66. Berndt A, Logan C. Serial analysis of gene expression. Encyclopedia of Neuroscience 2009;7:1193-8.

67. Noureddine MA, Li YJ, van der Walt JM, Walters R. Genomic convergence to identify candidate genes for Parkinson disease: SAGE analysis of the substantia nigra. Mov Disord. 2005; 20(10):1299–

68. Jin X, Xu A, Bie R. Cancer classification from serial analysis of gene expression with event models. Appl In Identification of plant defence genes in canola using Arabidopsis cDNA microarrays. Plant Biol (Stuttg). 10(5): 539-47.

69. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. Nat Rev Microbiol. 2012; 10(9):618-30.

70. Aldaz CM. Serial analysis of gene expression (SAGE) in cancer research. In: Ladanyi M, Gerald WL. Editors. Expression profiling of human tumors, diagnostic and research application. New Jersey: Human press. 2003; p.47-60.

71. Lu T., Lu G., Fan D., Zhu C., Li W., Zhao Q., et al. Function annotation of the rice transcriptome at single-nucleotide resolution by RNA-seq. *Genome Res.* 2010; 20: 1238–1249.

72. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M, Shou C, Raha D,

Gerstein M, Snyder M, Raha D, Gerstein M, Snyder M, Gerstein M, Snyder M, Snyder M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Sci. 2008; 320:1344–1349.

73. Mizuno H., Kawahigashi H., Kawahara Y., Kanamori H., Ogata J., Minami H., et al. (2012). Global transcriptome analysis reveals distinct expression among duplicated genes during sorghum-*Bipolaris sorghicola* interaction. *BMC Plant Biol.* 2012; 12: 121.

74. Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Meth. 2008; 5: 621–628.

75. Chew, W., Hrmova, M., Lopato, S. 2013. Role of Homeodomain Leucine Zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors. Inter. J. Mol. Sci. 2013; 14: 8122-8147.

76. Javelle M, Klein-Cosson C, Vernoud V, Boltz V, Maher C, Timmermans M, Depege-Fargeix N, Rogowsky P. Genome-wide characterization of the HD-ZIP IV transcription factor family in maize: preferential expression in the epidermis. Plant Phys. 2011; 157: 790–803.

77. Bass BL. How does RNA editing affect dsRNA-mediated gene silencing? Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2006;71:285–292.

78. Davidson, R.M., Gowda, M., Moghe, G., Lin, H., Vaillancourt, B. and Shiu, SH. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. *Plant J.* 2012; 71, 492–502.

79. Gao, L., Tu, Z.J., Millett, B.P. and Bradeen J.M. Insights into organ-specific pathogen defense responses in plants: RNA-seq analysis of potato tuber-*Phytophthora infestans* interactions. BMC Genomics, 2013; 14:340-352.

80. Ray, S., Anderson, J.M., Urmeev, F.I. and Goodwin, S.B. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant mol. Boil. 2003; 53: 741-754.

81. Habibi, M., Abiar Fini, A., Mirakhorli, N. and Mardi M. Study of Expression Pattern of S-Like RNase Gene to Several Fungal Diseases in Bread Wheat Habibi. Crop Biotech. 2012; 5: 85-92.

82. Sedaghatfar, E., Zamanizadeh, H.R., Roohparvar, R., Karimi Farsad, L., Fazeli, A., Rezaee, S. and Mardi, M. Gene expression profiling of defense-related genes resistant to *Septoria tritici* blotch in wheat. African J. of Biotech. 2012; 11: 13633-13644.