فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی و کاربرد آن در بیماری‌شناسی گیاهی

بنفشه صفایی فراهانی[1] و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا[2]*

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۲۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۱/۰۹/۲۰

صفایی فراهانی، ب. و مستوفی‌زاده قلمفرسا، ر. ۱۳۹۱. فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی و کاربرد آن در بیماری‌شناسی گیاهی. *دانش بیماری شناسی گیاهی* ۲(۱): ۳۳-۲۵.

چکیده

فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی، روشی برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها در مقیاس بزرگ است که بر پایه بررسی دورگ‌سازی بین توالی‌های کاوشگر و هدف استوار شده است. همچنین از این فنآوری می‌توان برای شناسایی موجودات مختلف نیز استفاده کرد. در ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی مجموعه‌ای از کاوشگرها به صورت نقاط ریز میکروسکوپی به یک سطح جامد متصل می‌شوند، پس از انجام دورگ‌سازی بین توالی‌های کاوشگر و هدف، میزان دورگ‌سازی با استفاده از روش‌های مختلفی مانند اندازه‌گیری میزان تابش رنگ‌های فلورسان مشخص می‌شود. بخش‌های مختلف یک آزمایشِ مبتنی بر فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی شامل ساخت تراشه دی‌اِن‌اِی، آماده کردن توالی هدف، انجام دورگ‌سازی، جمع‌آوری و واکاوی داده‌ها است. فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی درزمینه‌های مختلف بیماری‌شناسی گیاهی، از جمله تشخیص گونه‌های قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و ویروس‌ها و بررسی برهم‌کنش گیاه- بیمارگر کاربرد دارد.

واژه‌های کلیدی: ریزآرایه، دورگ، دی‌اِن‌اِی، ژن، فنآوری

* مسئول مکاتبه، پست الکترونیک : rmostofi@shirazu.ac.ir

مقدمه

بیان ژن در یک یاخته شامل دو فرآیند نسخه‌برداری و ترجمه است. تعیین توالی ژن نمی‌تواند اطلاعاتی درباره میزان بیان یا فعالیت ژن فراهم کند. ژن‌ها برای بیان شدن می‌باید به آرِن‌اِی پیک (messenger RNA) نسخه‌برداری شوند. بنابراین با اندازه‌گیری مقدار آرِن‌اِی پیکِ نسخه‌برداری شده می‌توان میزان بیان یا فعالیت ژن را مطالعه کرد (Arora *et al.*, 2006; Jaluria *et al.*, 2007). روش سنتی برای اندازه‌گیری بیان ژن، لکه‌گذاری شمالی (Northern blotting) است که تنها برای تعداد محدودی ژن قابل استفاده است. فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی (DNA microarrays technology) نیز مانند لکه‌گذاری شمالی بر پایه فرآیند دورگ‌سازی (Hybridization) توالی‌های کاوشگر (Probe) و هدف (Target) استوار بوده، اما قابل استفاده در مقیاس بزرگ است. این فنآوری قادر است که در یک زمان بیان هزاران ژن را نشان دهد، بنابراین ابزار قدرتمندی برای واکاوی‌های ژنتیکی به شمار می‌رود. همچنین این امکان وجود دارد که با به کار بردن کاوشگرهای اختصاصی از این فنآوری برای شناسایی گونه‌های مختلف جانداران استفاده کرد (Polabski & Kinmel, 2007).

۱- تعریف فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی، مجموعه‌ای از نقاط میکروسکوپی هستند که در یک نظم مشخص به یک سطح جامد متصل شده‌اند. این نقاط، کاوشگرهایی می‌باشند که هر کدام به گونه‌ای طراحی شده است که به یک توالی اختصاصی اسید نوکلئیک مربوط به یک ژن خاص، متصل می‌گردد. توالی‌هایی که به کاوشگرها متصل می‌شوند معمولاً توالی‌های هدف نامیده می‌شوند و توسط مولکول‌های قابل ردیابی مثل رنگ‌های فلورسان نشان‌دار می‌گردند. میزان اتصال هر کاوشگر و توالی هدفِ مربوط به آن با اندازه‌گیری میزان تابش رنگ‌های فلورسان در هنگام نگاره‌سنجی (Scanning)، کمّی‌سازی می‌شود. مقدار تشعشع مقیاسی برای اندازه گیری میزان بیان یک ژن خاص، که حاوی توالی هدف است، فراهم می‌کند (Li *et al.*, 2002; Polabski & Kinmel, 2007 ; Schena *et al.*, 1995).

۲- تاریخچه پیدایش فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی نخستین بار در سال ۱۹۹۵ برای واکاوی همزمان الگوی بیان ژن‌ها در مقیاس بزرگ به کار رفت. در آن زمان، محققین یک سیستم روباتیک را برای نقطه‌گذاری الیگونوکلئوتیدهای دی‌اِن‌اِی با ترتیبی مشخص روی یک اسلاید شیشه‌ای معرفی کردند. این اسلاید شیشه‌ایِ نقطه‌گذاری شده، تراشه دی‌اِن‌اِی (DNA chip) نامیده شد. در نخستین آزمایش تنها ۴۵ توالی الیگونوکلئوتیدی که نماینده بخش کوچکی از ژن‌های

Arabidopsis thaliana بود نقطه‌گذاری گردید. اما این کار الهام بخش آزمایش‌های بعدی شد (Schena *et al.*, 1995). از آن زمان تا کنون فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی به بخش مهمی از تحقیقات در بسیاری از زمینه ها تبدیل شده است.

۳- بخش‌های یک آزمایشِ مبتنی بر فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

یک آزمایشِ مبتنی بر فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی شامل ۳ بخشِ ساخت تراشه دی‌اِن‌اِی ، آماده کردن توالی هدف، دورگ‌سازی و همچنین جمع آوری و واکاوی داده‌ها (شکل ۱) است (Brewster *et al.*, 2004, Jaluria *et al.*, 2007, Polabski & Kinmel, 2007).

۳-۱- ساخت تراشه دی‌اِن‌اِی

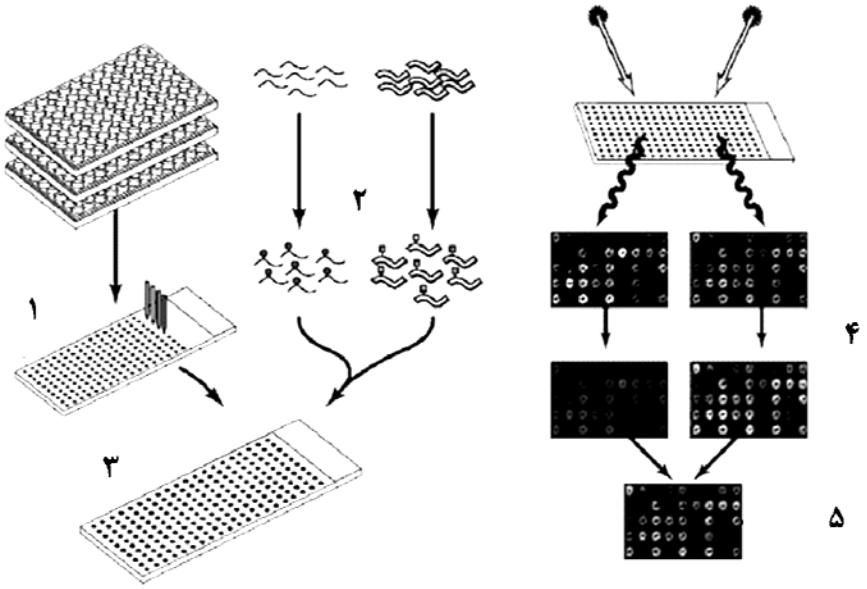
این مرحله شامل لکه‌گذاری مقدار اندکی از محلول کاوشگر روی اسلایدهای شیشه‌ای است که با استفاده از موادی مثل پلی‌لیزین (Poly-lysine) پوشیده شده‌اند. کاوشگرها با استفاده از تابش پرتوهای نور فرابنفش روی اسلاید تثبیت می‌شوند (Arora *et al.* 2006, Hegde *et al.* 2000).

۳-۲- آماده کردن هدف و انجام دو رگ‌سازی

نخستین و مهم‌ترین مرحله درآماده‌سازی توالی هدف، جداسازیِ کلّ آرِن‌اِی و یا آرِن‌اِی پیک از نمونه‌های تیمار و شاهد است. نمونه‌های آرِن‌اِی با استفاده از رنگ‌های فلورسان نشان‌دار می‌شوند. معمولاً نمونه تیمار به وسیله رنگ Cy5 که تولید رنگ فلورسان قرمز می‌کند و نمونه شاهد به وسیله‌ی رنگ Cy3 که تولید رنگ فلورسان سبز می‌کند، نشان‌دار می‌شوند. توالی‌های هدف نشان‌دار شده مربوط به تیمار و شاهد در یک تراشه دی‌اِن‌اِی واحد دورگ‌سازی می‌شوند. پس از آن به منظور پاک شدن توالی‌های متصل نشده به کاوشگر، تراشه‌های دی‌اِن‌اِی با استفاده از بافر شستشو داده می‌شوند(Brewster *et al.*, 2004; Richter *et al.*, 2002).

۳-۳- جمع آوری و واکاوی داده‌ها

ریز تراشه‌های دورگ‌سازی شده با استفاده از سیستمی که از لیزر به عنوان منبع انتشار نور برای ردیابی استفاده می‌کند، نگاره‌سنجی می‌شوند. این سیستم قادر است توالی‌های هدف نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسان متفاوت را از هم تشخیص دهد. تأثیر تیمار با محاسبه نسبتِ شدت پیام‌های (Signals) تیمار به شاهد (یعنی نسبت شدت پیام‌های قرمز به سبز) بررسی می‌شود. لکه‌های زرد نشان دهنده نسبت یک می‌باشند، بنابراین هیچ گونه تغییری



شکل ۱. مراحل فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی، ۱- لکه گذاری مقدار اندکی از محلول کاوشگر روی اسلایدهای شیشه‌ای توسط روبات، ۲- آماده کردن هدف؛ شامل استخراج آرِن‌اِی پیک از سلول‌های شاهد و تیمار و نشان‌دار کردن آرِن‌اِی با استفاده از رنگ‌های فلورسان، ۳- انجام دورگ‌سازی، ۴- نگاره‌سنجی ریز تراشه‌های دورگ‌سازی شده با استفاده از لیزر، ۵- بررسی تأثیر تیمار با محاسبه نسبتِ شدت پیام‌های تیمار به شاهد، یعنی نسبت شدت پیام‌های قرمز به سبز (Duggan *et al.*, 1999).

در سطح بیان ژن بین نمونه تیمار و شاهد وجود نداشته است. لکه‌های قرمز نشان دهنده نسبت بزرگ‌تر از یک می‌باشند، بنابراین نسخه برداری در نمونه تیمار بیش‌تر از شاهد است. لکه‌های سبز نشان دهنده نسبت کوچک‌تر از یک می‌باشند، بنابراین نسخه برداری در نمونه تیمار کم‌تر از شاهد است و سرانجام لکه‌های سیاه نشان می‌دهند که هیچ توالی هدفی به نشانگر متصل نشده است (Arora *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 1996; Francois *et al.*, 2005; Slonim, 2002). به منظور تأیید نتایجِ آزمایش‌های مبتنی بر فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی می‌توان از روش‌هایی مثل لکه‌گذاری شمالی برای تعدادی از ژن‌های کلیدی استفاده کرد (Polabski & Kinmel, 2007; Richter *et al.*,2002).

۴- زمینه‌های کاربرد فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی درزمینه‌های مختلفی مثل سم‌شناسی، زیست‌شناسی تکاملی، فیزیولوژی یاخته،

داروشناسی، زیست‌فنآوری و بیماری‌شناسی جانوری و گیاهی کـاربرد دارد (Arora *et al.*, 2006; Brewster *et al.*, 2004; Jaluria *et al.*, 2007; Kazan *et al.*, 2001; Lodha & Basak, 2012; Polabski & Kinmel, 2007; Pollack, 2007). این فنآوری می‌تواند مشخص کند که گیاهان چگونه به تنش‌های مختلف مثل کمبود مواد غذایی و حمله بیمارگرها واکنش نشان می‌دهند.

۵- کاربرد فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی در بیماری‌شناسی گیاهی

غلات توسط گونه‌های متفاوتی از جنس *Fusarium* آلوده می‌شوند. برخی از این گونه‌ها قادر به تولید ترکیبات بسیار سمی مانند تریکوتسین (Trichothecene) می‌باشند. تشخیص صحیح گونه‌های *فوزاریـوم*، بـرای تعیـین میـزان خطر استفاده از غلات آلوده به عنوان غذای انسان و دام ضروری اسـت. از فنـآوری ریزآرایـه‌هـای دی‌اِن‌اِی بـه منظـور تشخیص گونه‌های مختلف *فوزاریوم* که قادر به تولید تریکوتسین هستند، اسـتفاده شـده اسـت (Nicolaisen *et al.*, 2005). از این فنآوری برای تشخیص گندم‌های آلوده به گونه‌هـای *فوزاریـوم* نیـز اسـتفاده شـد (Pavlatova *et al.* 2011). همچنـین فنـآوری ریزآرایـه‌هـای دی‌اِن‌اِی بـرای تشـخیص دو قـارچ بیمـاری‌زای *Didymella bryoniae* و *Botrytis cinerea* که در گلخانه‌ها معمول می‌باشند استفاده شده است (Koch *et al.*, 2005). فنآوری ریزآرایه‌هـای دی‌اِن‌اِی برای تعیین الگوهای بیان ژن در بیمارگر و میزبان، در مرگ گیاهان سویای ناشـی از *Phytophthora sojae* (Moy *et al.*, 2004)، بررسی سازوکار مولکولی مقاومت به عامل بیماری بادزدگی سیب‌زمینی (Tian *et al.* , 2006) و بررسی پایه مولکولی تولید مثل جنسی در اُامیست‌ها نیز به کار رفته است (Prakob & Judelson, 2007).

استفاده از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی برای ردیابی ویروس‌ها، ویروئیدها و فیتوپلاسماهای گیاهی نیـز مفیـد است. تشخیص آزمایشگاهی ویروس‌هـای گیـاهی اغلـب بـا اسـتفاده از روش‌هـایی ماننـد واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز (Polymerase chain reaction = PCR) و الیـزا (Enzyme linked immunosorbent assay = ELISA) انجام می‌شود، اما این روش‌ها تنها قادرند ۱ یا تعداد اندکی بیمارگر را در هر واکنش ردیابی کنند. فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی روشی قابل اعتماد برای ردیابی هم‌زمان چندین بیمارگر در بافت است. از این فنآوری در ردیابی ویروس‌هـای اِی، اس، ام و وای سیب‌زمینی(PVA ، PVS، PVM و PVY) در آلودگی‌های مخلـوط یـا تکـی اسـتفاده شـده اسـت (Bystricka *et al.*, 2005; Hadidi *et al.*, 2004).

فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی در تشخیص گونه‌های مختلف نماتدها نیز کاربرد دارد. از این فنآوری برای ردیابی اختصاصی *Meloidogyne chitwoodi* ، یک نمـاتود قرنطینـه‌ای در اروپـا، اسـتفاده شـده اسـت (Francois *et al.*, 2005). نماتد سیستی سویا (*Heterodera glycines*) از جمله بیمارگرهای مهمی است که سبب خسـارت اقتصـادی

زیادی می‌شود. از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی برای تشخیص ژن‌هایی که در برهم‌کنش سازگار،که باعث ایجاد بیماری می‌شود، بین *Heterodera glycines* و سویا مؤثر هستند، استفاده شده است (Khan *et al.*, 2004).

تعیین الگوی بیان ژن درکاساوا در واکنش به آلودگی با *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* نیز با استفاده از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی مورد مطالعه قرار گرفته و تعدادی از ژن‌هایی که القا یا سرکوب می‌شوند، مشخص شده است (Lopez *et al.*, 2005). همچنین از این فنآوری برای تشخیص سریع چندین باکتری قرنطینه‌ای در اروپا استفاده شده است (Pelludat *et al.*, 2009). از جمله کارهای دیگر تأثیر استفاده از پروبنازول (Probenazole)، که یک القا کننده شیمیایی مقاومت اکتسابی سیستمیک به بیماری است، در بیان ژن‌های برنج پس از آلودگی به قارچ عامل بلاست با استفاده از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی است، که نتایج نشان داده که ژن‌هایی که در طی تیمار با پروبنازول تحریک می‌شوند، همان ژن‌هایی هستند که در برهم‌کنش گیاه-بیمارگر دخالت دارند(Shimono *et al.*, 2003).

۶- محدودیت‌های فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

هر گونه بحثی در خصوص فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی بدون توجه به محدودیت‌ها و پیچیدگی‌های آن ناقص است. ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی، سطوح آر‌اِن‌اِی پیک را اندازه گیری می‌کند که همیشه با سطوح پروتئین تولیدی هماهنگی ندارد، علاوه بر این قادر به ردیابی و اندازه‌گیری اثر تغییرات ایجاد شده در هنگام ترجمه و یا پس از آن (Translational or post translational modification) روی فعالیت پروتئین نیست. همچنین تراشه‌ها، کاوشگرها و تجهیزاتی که در این فنآوری استفاده می‌شوند گران‌قیمت هستند، اما انتظار می‌رود که در سال‌های آینده شاهد کاهش سریع قیمت باشیم (Brewster *et al.*, 2004; Everett *et al.*, 2010; Jaluria *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002).

نتیجه

ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی ابزاری قدرتمند برای واکاوی‌های ژنتیکی هستند. پیشرفت در زمینه استفاده از روبات، تولید اسلایدهای شیشه‌ای با کیفیت بالا، امکان انجام محاسبات پیشرفته و افزایش اطلاعات درباره توالی ژنومی موجودات زنده، استفاده از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی را گسترش داده است. گسترش استفاده از این فنآوری تغییرات اساسی در روش‌های مطالعه موجودات زنده ایجاد کرده است. این فنآوری اطلاعات زیادی را که با تعیین توالی ژنوم به دست آمده به کار می‌برد و به وسیله آن‌ها الگوهای بیان ژن را بررسی می‌کند. فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی

جنبه‌های جدیدی از برهم‌کنش گیاه و بیمارگر را آشکار کرده و این قابلیت را دارد که به ابزاری کلیدی برای طیف وسیعی از آزمایش‌ها در بیماری شناسی گیاهی تبدیل شود. اگرچه ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی به عنوان ابزاری برای کاربرد روزمره در آزمایشگاه‌ها گران هستند، اما به طور تاریخی مشخص شده است که هزینه تجهیزات مولکولی در طی زمان با افزایش حجم فروشِ آن‌ها کاهش می‌یابد. بنابراین انتظار می‌رود که در این فنآوری نیز شاهد کاهش سریع هزینه‌ها باشیم و با تبدیل این فنآوری به ابزاری روزمره در آزمایشگاه رؤیای داشتن یک آزمایشگاه در یک تراشه دی‌اِن‌اِی به حقیقت بپیوندد. بدون شک در سال‌های آینده استفاده از فنآوری ریزآرایه‌های دی‌اِن‌اِی دوره جدیدی را در دانش بیماری‌شناسی گیاهی به وجود خواهد آورد (Arora *et al.*, 2006; Brewster *et al.*, 2004; Everett *et al.*, 2010; Jaluria *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2002; Lodha & Basak, 2012; Polabski & Kinmel, 2007).

منابع

Arora, D. K., Berka, R. M. & Singh, G. B. 2006. Applied Mycology and Biotechnology. Elsevier, The Netherlands, 336p.

Brewster, J. L., Beason, K. B., Eckdahl, T. T. & Evans. I. M. 2004. The microarray revolution. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32:217-227.

Bystricka, D., Lenz, O., Mraz, I., Piherova, L. & Kmochd, M. 2005. Oligonucleotide-based microarray: A new improvement in microarray detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 128:176-182.

Cheung, V.G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R. & Childs, G. 1999. Making and reading microarrays. *Nature Genetics* 21:15-19.

Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J. M. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 21:10-14.

Everett, K. R., Rees-George, J., Pushparajah, I., Janssen,B. J. & Luo, Z. 2010. Advantages and disadvantages of microarrays to study microbial population dynamics – a minireview. *New Zealand Plant Protection* 63:1-6.

Francois, C., Kebdan, N., Barker, I., Tomlinson, J., Boonham, N. & Castagnone-Sereno, P.2005. Towards specific diagnosis of plant.parasitic nematodes using DNA oligonucleotide microarray technology: A case study with the quarantine species *Meloidogyne chitwoodi*. *Molecular and Cellular Probes* 20:64-69.

Hadidi, A., Czosnek, H. & Barba, M. 2004. DNA microarrays and their potential applications for the detections of plant viruses, viroids and phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 86:97-104.

Hegde, P., Abernathy, R. K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J. E., Snesrud, E., Lee, N. & Quackenbush, J. 2000. A concise guide to microarray analysis. *Bio Techniques* 29:548-562

Jaluria, P., Konstantopoulos, K., Betenbaugh, M. & Shiloach, A. 2007. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microbial Cell Factories* 6:4.

Kazan, K., Schenk, P. M., Wilson, I. & Manner, J. 2001. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defense responses. *Molecular Plant Pathology* 2:177-185.

Khan, R., Alkharouf, N., Beard, H., Macdonald, M., Chouikha, I., Mever, S., Grefensttette, J., Knap, H. & Matthews, B. 2004. Microarray analysis of gene expression in soybean roots susceptible to the soybean cyst nematode two days post invasion. *Journal of Nematology* 36:241-248.

Koch, K. A., Li. P. C. H. & Utkhede, R. S. 2005. Evaluation of thin films of agarose on glass for hybridization of DNA to identify plant pathogens with microarray technology. *Analytical Biochemistry* 342:93-102.

Lodha, T. D. & Basak, J. 2012. Plant-pathogen interactions: what microarray tells about it. *Molecular Bio Technology* 50:87-97.

Li, X., Gu, W., Mohan. S. & Baylink, D. J. 2002. DNA microarrays: their use and misuse. *Microcirculation* 9:13-22.

Lopez, C., Soto, M., Restrepo, S., Piegu, B., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J. & Verdier, V. 2005. Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* infection in cassava using a cDNA microarray. *Plant Molecular Biology* 57:393-410.

Moy, P., Qutob, D., Chapman, B. P., Atkinson, I. & Gijzen, M. 2004. Patterns of gene expression upon infection of soybean plants by *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17:1051-1062.

Nicolaisen, M., Justesen, A. F., Thrane, U., Skouboe, P. & Holmstrbm, K. 2005. An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and non-producing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *Journal of Microbiological Methods* 62:57- 69.

Pavlatova, L., Novotny, D., Hodek, J., Chrpova, J. & Ovesna, J. 2011. Utilization of DNA microarrays for detection and identification of selected *Fusarium* species from the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science* 29:93-101.

Polanski, A. & Kinmel, M. 2007. Bioinformatics. Springer, New York,USA, 336p.

Pollack, J. R. 2007. A perspective on DNA microarrays in pathology research and Practice. *American Journal of Pathology* 171:375-385.

Prakob, W. & Judelson, H. S. 2007. Gene expression during oosporogenesis in heterothallic and homothallic *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 44:726-739.

Pelludat, C., Duffy, B.& Frey, J. E. 2009. Design and development of a DNA microarray for rapid identification of multiple European quarantine phytopathogenic bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 125:413-423.

Richter, A., Schwager, C., Hentze, S., Ansorge, W., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. 2002. Comparison of fluorescent tag DNA labeling methods used for expression analysis by DNA microarrays. *Bio Techniques* 33:620-630.

Shimono, M., Yazaki, J., Nakamura, K., Kishimoto, N., Kikuchi1, S., Iwano, M., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T. & Nishiguchi, M. 2003. cDNA microarray analysis of gene expression in rice plants treated with probenazole, a chemical inducer of disease. *Journal of General Plant Pathology* 69:76-82.

Slonim, D. K. 2002. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nature Genetics* 32:502-508.

Tian, Z. D., Liu, J., Wang, B. L. & Xie, C. H. 2006. Screening and expression analysis of *Phytophthora infestans* induced genes in potato leaves with horizontal resistance. *Plant Cell Reports* 25:1094-1103.