کاربرد فن‌آوری ریزآرایه‌ها در نماتدشناسی گیاهی

حبیب‌اله چاره‌گانی ✉

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۱۸

چاره‌گانی ح. ۱۳۹۴. کاربرد فن‌آوری ریزآرایه‌ها در نماتدشناسی گیاهی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۵(۱):۸۹-۷۶.

چکیده

در طی یک واکنش سازگار، نماتدهای مولد غده ریشه(*Meloidogyne* spp.) با تحریک تولید سلول‌های غول‌آسای چند هسته‌ای منجر به ایجاد تمایز در ریشه گیاه میزبان می‌گردند. رشد و تکثیر بیش‌از اندازه سلول‌های اطراف سلول‌های غول منجر به تولید غده روی ریشه گیاه میزبان می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده که تغییرات حاصل در سلول‌های ریشه و تولید مکان‌های تغذیه‌ای با کارکرد و شکل اختصاصی، نیازمند ایجاد تغییرات در میزان بیان تعداد زیادی از ژن‌ها درون سلول‌های میزبان می‌باشد. روش‌های قدیمی بررسی تغییرات در میزان بیان ژن‌ها، شامل تفاوت در بیان ژن‌ها در سلول‌های سالم و آلوده، ردیابی ژن‌های مشخص با استفاده از نشانگر GUS یا استفاده از روش دورگ‌سازی در محل و روش به دام اندازی راه‌انداز ژن، نشان داده‌اند که درون سلول‌های غول‌آسا در مقایسه با بافت‌های سالم ریشه در حدود ۵۰ ژن گیاهی افزایش بیان و ۱۰ ژن کاهش بیان پیدا می‌کنند. فن‌آوری ریزآرایه این امکان را به محققین می‌دهد که در یک مرحله آزمایش، تغییرات در بیان تعداد بسیار زیادی از ژن‌ها در همکنش گیاه-نماتد را مورد بررسی قرار دهند. ریزآرایه DNA مجموعه‌ای از نقاط میکروسکوپی DNA روی یک بستر جامد می‌باشد. هر کدام از نقاط DNA شامل $۱۰^{-۱۲}$ مول از یک توالی DNA مشخص به نام پروب می‌باشد که می‌تواند تکه کوچکی از یک ژن باشد که با cDNA یا cRNA استخراج شده از نمونه مورد بررسی (نمونه هدف) هیبرید شود. پروب-هدف هیبرید شده معمولاً بوسیله هدف نشاندار شده با رنگ‌های فلورسانت یا نقره ردیابی و تشخیص داده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ریزآرایه، ژن، گیاه، نماتد، *Meloidogyne*

مقدمه

تولید و بقای مکان‌های تغذیه‌ای تولید شده توسط نماتد درون بافت میزبان، بستگی به تغییراتی در سطح بیان ژن‌های گیاهی دارد. یکی از فن‌آوری‌های جدید بررسی بیان ژن‌ها، ریزآرایه (Microarray) می‌باشد که اجازه

✉ مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: habib.charegani@gmail.com

شناسایی هزاران ژن مربوط به نماتد یا گیاه را در طی حمله نماتد به گیاه فراهم می‌آورد. در ابتدا از سیستم ریزآرایه جهت بررسی بیان ژن‌ها در تمامی بافت ریشه گیاهان آلوده و یا غده‌ها و محل حمله نماتد استفاده می‌شد اما اخیراً با تلفیق سیستم Microarray و Laser-assisted microdissection، امکان بررسی ژن‌ها در مکان‌های تغذیه‌ای نیز امکان‌پذیر می‌باشد (Li *et al.* 2008).

۱- تحلیل زمانی و مکانی بافت‌های گیاهی برای مطالعه میزان بیان ژن‌ها

در طول فرآیند بیماری‌زایی، نماتدهای انگل داخلی ساکن در بافت آلوده گیاهی، باعث تغییر در میزان بیان ژن‌های گیاه میزبان می‌شوند. استفاده از اندام‌های گیاهی، یک عامل مهم جهت بررسی این تغییرات است. در اغلب موارد، نتایج بررسی میزان بیان ژن‌ها در ارتباط با تمامی بافت گیاهی مورد هجوم با زمانی که تمرکز بررسی روی بافت خاصی از گیاه می‌باشد، متفاوت است. برای مثال معمولاً نتایج بررسی بیان ژن در مکان‌های تغذیه‌ای نماتدها نسبت به بافت کامل ریشه همان گیاهان، از نظر نوع و میزان ترکیبات، متفاوت است. در این مورد اغلب مطالعات در زمینه همکنش گیاه-نماتد، تمرکز بر بافت کامل ریشه، غده‌ها و مکان‌های تغذیه‌ای دارد. مطالعات بر روی تمامی بافت ریشه‌های آلوده، موجب شناسایی ژن‌هایی گردید که به طور غیرمستقیم به‌وسیله حمله نماتدها به ریشه، در میزان بیان تغییر پیدا می‌کردند، اما مکان‌های تغذیه‌ای ایجاد شده در اثر حمله نماتدها به ریشه، کمتر از ۵٪ از بافت ریشه را شامل می‌شوند. از آنجایی که تغییرات عمده در میزان بیان ژن‌ها مربوط به مکان‌های تغذیه‌ای است، از این رو RNA های ردیابی شده در این مطالعات، بسیار کمتر از میزان تولید شده در مکان‌های تغذیه‌ای است. تحلیل بافتهای اختصاصی از جمله غده‌ها و مکان‌های تغذیه‌ای، اطلاعات بسیار جالب و دقیقی در ارتباط با تغییر در میزان بیان ژن و پاسخ‌های موضعی گیاه به نماتد انگل در اثر همکنش گیاه-نماتد می‌دهد. بررسی اثر نماتد روی یک‌سری گیاهان مهم و اقتصادی ازجمله *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.، *Glycine max* (L.) Merr.، *Nicotiana tabacum* L. و *Solanum lycopersicum* L.، روشی دیگر برای مطالعه بیان ژن در اثر همکنش نماتد-گیاه فراهم می‌آورد. استفاده دقیق از ارقام مقاوم و یا حساس این گیاهان، ابزاری قدرتمند در شناسایی ژن‌های گیاه که باعث تنظیم پاسخ‌های گیاه به حمله نماتدها می‌شود، در اختیار محققان قرار داده است. همچنین مطالعه جمعیت‌های مختلف بیماری‌زا یا غیربیماری‌زا از نماتدهای *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood، *M. javanica* (Treub) Chitwood،

Heterodera glycines Ichinohe، *M. hapla* Chitwood، *M. arenaria* (Neal) Chitwood، *H. schachtii* Schmidt.، *Globodera pallida* Stone و *G. rostochiensis* Woil. ابزاری تکمیلی در شناسایی ژن‌های مهم در فرآیند بیماری‌زایی این نماتدها فراهم آورده است.

از دیگر روش‌ها جهت بررسی ژن‌ها در همکنش نماتد-گیاه می‌توان به استخراج RNA از بافت کامل ریشه و یا نقاط اختصاصی آلوده شده توسط نماتد اشاره نمود. سپس از این RNA ها تولید cDNA کرده و با استفاده از روش همسانه‌سازی کردن، cDNA ها را مورد بررسی قرار می‌دادند (Niebel *et al.* 1995). با بهبود روش‌های مولکولی، با استفاده از سیستم PCR، رونوشت‌های cDNA ها را به طور مستقیم مورد بررسی قرار می‌دادند (Hermsmeier *et al.* 2000). جدیداً استفاده از فن آوری ریزآرایه (Microarray) به عنوان روشی بسیار کارا برای شناسایی ژن‌های دخیل در همکنش گیاه- نماتد مورد استفاده قرار گرفته است.

۲- کاربرد ریزآرایه‌ها در علوم زیستی

تعیین ترادف ژنوم گیاهان و جانداران مختلف، اطلاعات بسیار زیادی را فراهم نموده است و در این راستا نرم‌افزارهای متعددی برای پیش بینی ژن‌ها براساس ترادف نوکلئوتیدها طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفته است. با این وجود، این نرم‌افزارها هنوز نمی‌توانند با دقت لازم، ژن‌ها را شناسایی نمایند و از طرفی پیش‌بینی نحوه بیان ژن از طریق اطلاعات ترادف DNA کاری مشکل و همراه با اشتباه است. بنابراین نیاز به فناوری‌هایی بوده که بتوانند حجم بسیار زیادی از ژن‌ها را تجزیه نمایند. فناوری ریزآرایه نیز برهمین اساس توسعه یافت که امکان مطالعه همزمان چندین هزار ژن را در سطح DNA، RNA یا پروتیین فراهم می‌سازد (قره‌یاضی و همکاران ۱۳۸۸). در این فن‌آوری مجموعه‌ای از نقاط میکروسکوپی مربوط به نمونه‌های DNA، RNA، پروتیین یا بافت که شناخته شده و مشخص می‌باشند روی یک فازجامد برای مثال اسلاید شیشه‌ای یا صفحات سیلیکون ثابت می‌شود. این ثابت‌سازی معمولاً توسط ربات‌هایی که اصطلاحاً Arrayer نامیده می‌شوند انجام می‌شود، بنابراین نوع ریزآرایه بستگی به موادی دارد که روی اسلاید گذاشته می‌شود. اگر DNA باشد، به آن ریزآرایه DNA (DNA microarray)، اگر RNA باشد به آن ریزآرایه RNA (RNA micoarray)، اگر پروتیین باشد به آن ریزآرایه پروتیین (Protein microarray) و اگر ماده به دست آمده از بافتی ویژه باشد، ریزآرایه بافت (Tissue microarray) می‌گویند. به‌دلیل این که نمونه‌ها به‌طور

منظم روی اسلاید قرار می‌گیرند، داده‌های به‌دست آمده از ریزآرایه را می‌توان به نمونه‌های مربوط به خود نسبت داد، بدین معنی که هر ژن روی ریزآرایه دارای نشانی مشخص است. تعداد نمونه‌های منظم قرار گرفته روی ریزآرایه می‌تواند درحد صدها هزار باشد (قره‌یاضی و همکاران ۱۳۸۸).

۳- ریزآرایه DNA

ریزآرایه DNA معمول‌ترین نوع ریزآرایه است و عبارت است از مجموعه‌ای از نقاط میکروسکوپی DNA که مکمل توالی‌های خاصی از cDNA هدف بوده و به سطح جامدی مثل شیشه، پلاستیک یا تراشه سیلیکون متصل شده و یک آرایه را تشکیل می‌دهند. استفاده از ریزآرایه DNA یک تکنولوژی چندگانه است که در بیولوژی مولکولی و پزشکی به کار می‌رود. این نوع آرایه شامل سری‌های آرایه‌ای هزاران نقطه میکروسکوپی الیگونوکلئوتیدهای DNA است که هر کدام شامل یک پیکومول ($۱۰^{-۱۲}$) از ترادف DNA خاصی می‌باشد که به‌عنوان پروب (Prob) شناخته شده است. این ریزآرایه می‌تواند بخش کوچکی از یک ژن یا دیگر عناصر DNA باشد که در هیبریداسیون با نمونه هدف (cDNA یا cRNA) به کار برده می‌شود. هیبریداسیون پروب-هدف اغلب توسط برچسب‌های فلوروفور، نقره یا شب‌تاب‌های شیمیایی شناخته و اندازه‌گیری می‌شود. برای این منظور، پس از استخراج و خالص‌سازی mRNA هدف از بافت، با انجام رونویسی معکوس اقدام به سنتز رشته اول cDNA گردیده و سپس cDNA را به رنگ‌های فلوئورسانت مانند cy3 متصل کرده و محلول حاصل را بر روی سطح جامد که از قبل با پروب‌های مشخص و اختصاصی پوشانده شده ریخته و پس از عمل هیبریسازی، اقدام به شستشو و پردازش داده‌ها می‌شود (Schena *et al*. 1995). اسید نوکلئیک هدف با این عوامل (نشانگرها) نشاندار می‌شود تا تشخیص فراوانی نسبی ترادف‌های اسید نوکلئیک انجام گیرد. از آنجایی که یک آرایه می‌تواند حاوی ده‌ها هزار نشانگر باشد، آزمایش ریزآرایه می‌تواند تست‌های ژنتیکی زیادی را به طور موازی به انجام رساند؛ بنابراین، آرایه‌ها به میزان زیادی انواع مختلف تحقیقات را به نتیجه می‌رسانند (Lashkari *et al.* 1997). در ریزآرایه‌ی استاندارد، پروب‌ها به سطح جامد با پیوندهای کووالانسی به ماده شیمیایی اپوکسی سیلان، آمینوسیلان، لیزین و پلی اکریل آمید الحاق می‌شوند. سطح جامد می‌تواند شیشه یا تراشه‌های سیلیکون باشد که به عنوان تراشه ژنی یا تراشه آفی (Affy chip)، زمانی که تراشه آفی متریکس (Affymetrics) به کار برده می‌شود، شناخته می‌شوند.

۴- اصول ریزآرایه DNA

اصول اساسی ریزآرایه‌ها، هیبریداسیون بین دو رشته DNA است که به‌وسیله خصوصیت مکمل بودن ترادف‌های اسیدنوکلئیک در یک جفت رشته با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین بازجفت‌های نوکلئوتیدی ایجاد می‌شود. تعداد زیاد باز جفت‌ها در ترادف نوکلئوتیدی به معنی پیوندهای هیدروژنی محکم‌تر بین دو رشته است. بعد از شستشوی ترادف‌های غیراختصاصی، تنها جفت رشته‌های محکم به صورت هیبرید باقی می‌مانند هرچه جفت‌بازهای بیشتری با هم مکمل شوند، پیوند هیدروژنی قوی‌تر می‌باشد. چنین اتصالی در اثر شستشو از بین نمی‌رود درحالی‌که اتصال‌های ضعیف که جفت‌بازهای کمتری را به اشتراک می‌گذارند، با شستشو از سیستم حذف می‌شوند. میزان شدت و قدرت سیگنال نهایی وابسته به میزان نمونه‌هایی است که با توالی‌های روی سطح، اتصال قوی برقرار کرده‌اند. ریزآرایه‌ها برای اندازه‌گیری نسبی به کار می‌روند که شدت یک حالت با شدت حالت دیگر تحت شرایط متفاوت مقایسه می‌شود (Schena *et al.* 1995). نکته دارای اهمیت طول پروب تهیه شده می‌باشد. در مطالعه‌ای در این زمینه، پروب‌های مختلف با طول ۲۵ تا ۱۰۰۰ توکلوتید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروب‌های با طول ۱۵۰ نوکلوتید کمترین میزان اتصال با سایر پروب‌ها را داشته (Self Dimer) و بالاترین بازده در اتصال با DNA هدف را دارا می‌باشند اما پروب‌هایی با اندازه کوچکتر بازده کمتر در اتصال با DNA هدف داشتند و پروب‌هایی با اندازه بزرگتر میزان دیمر زیادی را دارا بودند (Chou *et al.* 2004).

۵- ساختن ریزآرایه DNA

ریزآرایه‌ها معمولاً از قرار دادن نقاط DNA روی یک صفحه جامد مانند یک سطح شیشه‌ای ایجاد می‌گردند. استفاده از سطوح شیشه‌ای صاف برای قرار دادن DNA، امکاناتی را فراهم می‌سازد که عبارتند از: قرار دادن مولکول‌ها به طور موازی در کنار هم کوچک نمودن اندازه کل فرآیند، استفاده از رنگ‌های فلورسنت برای شناسایی، امکان استفاده از اسکنرهای لیزری به دلیل این که موادی که روی سطح قرار می‌گیرند به داخل آن نفوذ نمی‌کنند (Jaccoud *et al.* 2001). دو روش عمده برای ساخت تراشه‌های DNA به صورت تجاری شامل فتولیتوگرافی و شبکه‌سازی مکانیکی است. آرایه‌هایی که با روش فتولیتوگرافی ایجاد می‌گردند به آرایه‌های آفی‌متریکس معروف می‌باشند. در این روش از الیگونوکلئوتیدهای کوتاه ۲۵ بازی یا کمتر روی یک سطح شیشه‌ای یا سیلیکونی به ابعاد یک

سانتی‌متر مربع استفاده می‌شود. انجام این فرآیند به صورت اقتصادی درآمده و به طور گسترده استفاده می‌شود. به طوری که برای بسیاری از موجودات زنده مهم از جمله انسان، موش، خرگوش و مخمر این نوع از ریزآرایه‌ها وجود دارند (Lausted *et al*. 2004). آرایه‌هایی که با روش شبکه‌سازی مکانیکی ایجاد می‌گردند به آرایه‌های نقطه‌ای معروف می‌باشند و برپایه قراردادن فیزیکی مواد روی سطوح با استفاده از سوزن‌های مخصوص استوار است. در این روش از محصولات PCR، DNA ژنومی، کروموزوم‌های مصنوعی مخمر، پلاسمیدها یا الیگونوکلئوتیدهای طویل (۳۰-۷۰ باز) استفاده می‌شود. برای ایجاد شبکه‌ای از DNA برروی اسلایدها، از بازوی روباتی استفاده می‌شود (Jaccoud *et al.* 2001).

۶- تجزیه داده‌های ریزآرایه

ریزآرایه ابزار مناسبی است که امکان بررسی هزاران ژن را به صورت همزمان در اختیار محققین قرار می‌دهد. هر آزمایش ریزآرایه بر پایه هفت مرحله شامل ۱) نمونه‌گیری، ۲) خالص‌سازی نمونه و جداسازی mRNA ها، ۳) انجام رونویسی معکوس و تهیه cDNA ها، ۴) متصل کردن cDNA به رنگ‌های فلورسانت مانند cy3، ۵) ریختن محلول بر روی سطح ریزآرایه که از قبل توسط توالی‌های ژن مورد نظر پوشیده شده است، پس از مدتی هیبریداسیون میان cDNA ها و پروب‌ها انجام گرفته، ۶) شستشو و ۷) بررسی و پردازش استوار است (Hobman *et al*. 2007). در مرحله‌ی بدست آوردن اطلاعات بایستی از نرم‌افزارهای مختلفی که در دسترس می‌باشند استفاده کرد. نرم‌افزار پردازش تصویر که نقاط روی آرایه را شناسایی کرده و تراکم سیگنال‌ها را در آن‌ها اندازه‌گیری می‌کند. قبل از تجزیه داده‌ها ابتدا اطلاعات مربوط به شدت سیگنال‌های ایجاد شده برای هر نقطه در سطح آرایه نرمال گردیده و سپس بسته به نوع و هدف آزمایش روش‌های آماری متنوعی برای تجزیه داده‌های ریزآرایه استفاده می‌شود. برای این منظور نرم‌افزارهای زیادی نیز در دسترس می‌باشد (Schena *et al.* 1995)

۷- تحلیل‌های ریزآرایه‌ای در همکنش گیاه-نماتد

نماتدشناسان مطالعاتی جهت بررسی اهمیت فن‌آوری ریزآرایه Microarray و استفاده از آن در بررسی تغییرات ژن در میزبان و یا بیمارگر در همکنش‌های مختلف، اثر نماتد مولد غده و مولد سیست جهت بررسی بیان ژن‌ها در بافت کامل ریشه انجام گرفته است (Klink *et al.* 2010، Alkharouf *et al.* 2006، Hammes *et al.*

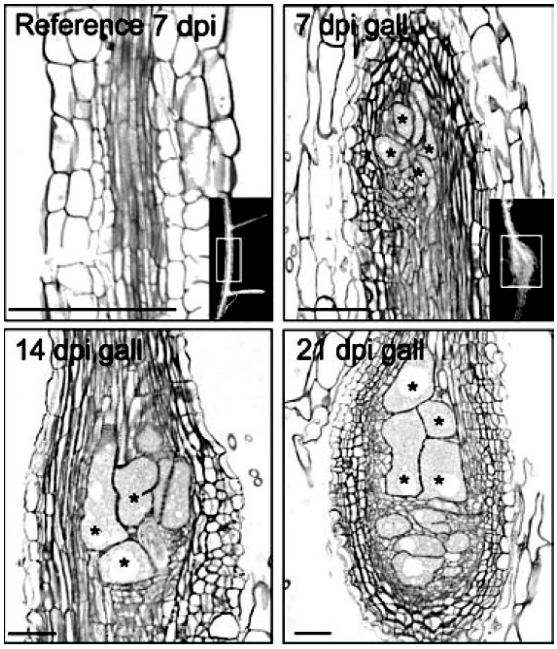
2006، Khan *et al.* 2004 ، Puthoff *et al.* 2003). مواد اولیه تحقیقات جهت تحلیل‌های Microarray از بافت‌های غده و مکان‌های تغذیه‌ای نماتدها نیز به‌دست می‌آید (Schaff *et al.* 2007, Fuller *et al.* 2007).

۸- مطالعه بافت کامل ریشه با استفاده از ریزآرایه‌ها

استفاده از تمامی بافت ریشه نسبت به استفاده از بافتهای اختصاصی جهت استفاده در مطالعات ریزآرایه از نظر اجرا بسیار ساده‌تر می‌باشد اما وجود میزان زیاد از بافتهای ریشه غیر هدف نماتد باعث رقیق شدن میزان رونوشت‌های ژن‌های تغییر یافته در اثر همکنش نماتد-گیاه می‌گردد و درنهایت باعث کم شدن حساسیت ریزآرایه می‌گردد. یکی از اولین مطالعات ریزآرایه‌ای در زمینه همکنش نماتد-گیاه توسط پوتوف و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گرفت. در این تحقیق، تغییر در فراوانی رونوشت‌های ژن‌ها در طول مراحل آلودگی اولیه آرابیدوپسیس توسط لاروهای بیماری‌زای *H. schachtii* و *H. glycines* مورد بررسی قرار گرفت. سه روز پس از مایه‌زنی گیاهان با نماتدهای مذکور، RNA ها از تمامی بافت ریشه استخراج شده و برای هیبریداسیون با Arabidopsis Genechip استفاده شدند. بیش از ۸۲۰۰ ژن برروی تراشه مشخص شدند، در این میان مشخص شد ۱۲۸ ژن به صورت اختصاصی در ریشه‌های آلوده بیان می‌گردند اما در ریشه‌های سالم (بدون مایه‌زنی) بیان نگردیدند. همچنین مشخص شد که در ریشه‌های آلوده به *H. schschtii* رونوشت‌های ۸۲ ژن به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و ۱۱ عدد از این رونوشت‌ها در ریشه‌های آلوده به *H. glycines* نیز افزایش در میزان تولید داشتند. از طرف دیگر، تعداد ۴۶ ژن در ریشه‌های آلوده به *H. schschtii* سرکوب در حالی که تنها یک ژن در ریشه‌های آلوده به *H. glycines* سرکوب شد (Puthoff *et al.* 2003).

۹- تحلیل‌های ریزآرایه‌ای مربوط به بافت‌های غذا دهنده و سلول‌های آلوده شده به نماتد

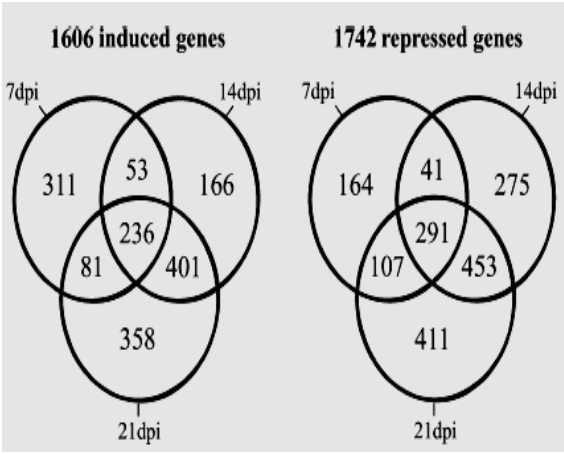
برخی از محققین به منظور افزایش احتمال یافتن ژن‌هایی که در همکنش نماتد گیاه، تغییر در میزان بیان پیدا می‌کنند، مطالعات خود را محدود به بافت‌هایی از ریشه که مسئول تأمین مواد غذایی برای مکان‌های تغذیه‌ای و محل‌های آلوده شده توسط نماتد می‌باشند، کرده‌اند. جیمز و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از این رهیافت، بیان ژن‌ها در ریشه آرابیدوپسیس آلوده شده به *M. incognita* در سه زمان ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی را بررسی نمودند. این زمان‌ها به ترتیب عبارت از القاء تولید، توسعه و تکامل سلول‌های غول‌آسا بودند (شکل ۱). برای هر بازه



شکل ۱. مراحل رشد سلول‌های غول‌آسا در زمان‌های صفر، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز پس از حمله نماتد *Meloidogyne incognita* به ریشه (Jammes *et al.* 2005).

زمانی RNA از ۱۵۰۰ برش از بافت‌های آلوده و همچنین از ریشه گیاهان شاهد (به جز مریستم جانبی و نوک ریشه) استخراج گردید. RNA ها نشانگذاری شده و برای هیبریداسیون با آرایه CATMA chip که حاوی ۲۴۵۷۶ توالی ژن اختصاصی (GST) (specific gene-sequence tag) برای آرابیدوپسیس بود، استفاده گردید. تحلیل داده‌ها نشان داد که ۳۳۷۳ ژن در اثر آلودگی به نماتد، میزان بیان متفاوتی نسبت به گیاهان شاهد دارند(شکل ۲). در این میان ۱۶۰۶ القا و ۱۷۴۲ ژن کاهش بیان از خود نشان دادند (Jammes *et al.* 2005).

اغلب ژن‌هایی که دچار تغییر در میزان بیان در غده‌ها می‌شوند، در متابولیسم سلولی یا ایجاد تغییر در دیواره سلولی میزبان دخیل مؤثر هستند. از جمله ژن‌های تغییر دهنده ساختار دیواره سلولی می‌توان به Beta-xylosidases، Beta-1,4-endoglucanases، Xyloglucan endotransglycosylases، Polygalacturonases و Expansions اشاره نمود. بیان بسیاری از ژن‌های WRKY (خانواده مهمی از عامل‌های رونویسی که نقش‌های مهمی در گیاه ازجمله پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، پیری، خواب و جوانه‌زنی بذر و برخی فعالیت‌های رشد و نموی را بر عهده دارند) در غده‌ها، کاهش یافته و این مسئله باعث افزایش این فرضیه



شکل ۲. تعداد ژن‌ها با افزایش بیان (چپ) و با کاهش بیان (راست) در آرابیدوپسیس پس از ۷ (7dpi)، ۱۴ (14dpi) و ۲۱ (21dpi) روز پس از مایه‌زنی با *Meloidogyne incognita* (Jammes *et al.* 2005).

می‌شود که نماتدهای انگل داخلی ساکن ازجمله نماتدهای مولد غده، دارای راه‌کارهایی برای سرکوب کردن واکنش‌های دفاعی گیاهان هستند (Jammes *et al.* 2005).

۱۰- تحلیل‌های ریزآرایه‌ای برای مکان‌های تغذیه‌ای نماتدها

محققین از مکان‌های تغذیه‌ای نماتدهای مولد غده و مولد سیست جهت انجام مطالعات ریزآرایه‌ای به منظور بررسی تغییرات در میزان بیان ژن در اثر حمله این نماتدها استفاده کرده‌اند؛ اما مشکلی که در استفاده از این اندام‌ها وجود دارد، دسترسی به این اندام‌ها درون بافت ریشه می‌باشد. اولین مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شد، توسط ویلسون و همکاران در سال ۱۹۹۴ بود که با استفاده از فن‌آوری برش‌دهی دستی، سلول‌های غول‌آسای حاصل از نماتدهای مولد غده در ریشه گوجه‌فرنگی را استخراج نمود (Wilson *et al.* 1994). اخیراً با استفاده از فن آوری Laser-Capture Microdissection (LCM) از برش‌های ریشه، می‌توان مکان‌های تغذیه‌ای را جدا نمود (Ramsay *et al.* 2004). استفاده همزمان از فن آوری Laser-Capture Microdissection و Microarray، یک فن‌آوری بسیار قدرتمند جهت اکتشاف بیان ژن در مکان‌های تغذیه‌ای نماتدها به‌وجود آورده است. یکی از اولین تحقیقاتی که با استفاده از این دو فن‌آوری صورت گرفت توسط ایتال و همکاران در سال ۲۰۰۷ بود. در این مطالعه دو روز پس از مایه‌زنی *H. glycines* به سویا رقم Williams 82، RNA از syncytia استخراج گردید. جهت انجام

آزمایش ریزآرایه از تراشه Affymetrix استفاده شد. نتایج نشان داد که ۱۱۱۶ ژن القاء و ۶۴۹ ژن نسبت به گیاهان شاهد، کاهش بیان داشتند. یکسری از ژن‌های دخیل در محافظت گیاه در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله ژن‌های پاسخی به زخم و تنش‌های اسمزی دچار کم شدن میزان بیان شدند و این مسئله باعث پیشنهاد این موضوع می‌شود که سازوکارهای دفاعی گیاه در همکنش‌های سازگار سرکوب می‌شوند (Ithal *et al.* 2007). در مقابل، برخی ژن‌ها که در متابولیسم اولیه و ثانویه ژن‌های Peroxidases و همچنین در تغییرات دیواره سلولی دخیل هستند، افزایش در میزان رونوشت‌ها پیدا می‌کنند (Ithal *et al.* 2007). Peroxidases در تخریب دیواره سلول‌های مجاور و اتصال اجزای مختلف دیواره‌های سلولی مجاور مؤثر است (Passardi *et al.* 2004). در تحلیل‌ها مشخص شد که تعدادی از ژن‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی اکسین و اتیلن، میزان بیانشان تغییر می‌کند (Ithal *et al.* 2007). اهمیت اکسین و اتیلن در تشکیل و توسعه Syncytia در مطالعات مختلف مشخص شده است (Mazarei *et al.* 2002، Wubben *et al.* 2001). همچنین مشخص شد که یکسری از ژن‌های دخیل در بیوسنتز جیبرلین و سیتوکینین در Syncytia تغییر در میزان بیان پیدا می‌کنند (Ithal *et al.* 2007).

نتیجه‌گیری

در اثر حمله نماتدهای مولد غده و سیست، یکسری مکان‌های تغذیه‌ای درون ریشه میزبان برای نماتد تولید می‌شود. باوجود بیش از یک دهه بررسی ژن‌های نماتدی و گیاهی مسئول در تشکیل و توسعه مکان‌های تغذیه‌ای به طور دقیق مشخص نشده‌اند. پژوهش‌های اخیر با استفاده از فن‌آوری ریزآرایه‌ها ابزاری قدرتمند برای بررسی همزمان تغییر در میزان بیان هزاران ژن درون مکان‌های تغذیه‌ای را فراهم آورده است. ریزآرایه‌هایی جهت گیاهان مدل مانند آرابیدوپسیس و همچنین گیاهان تجاری ازقبیل گوجه‌فرنگی و سویا تولید شده‌اند که امکان بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در رابطه نماتد- گیاه را به محققین داده‌اند. علاوه بر این، گیاهان حساس، مقاوم و غیر میزبان همراه با سویه‌های بیمارگر و غیربیمارگر نماتدها، مواد اولیه بسیار مناسبی برای تحلیل‌های مقایسه‌ای جهت رسیدن به دلیل تفاوت‌ها در مقاومت و حساسیت گیاهان به نماتدها می‌باشند. با توجه به مزایای بسیار زیاد این روش در حوزه‌های پروتئومیکس و ژنومیکس می‌توان چشم انداز قابل توجهی را برای این فن‌آوری قایل شد. با توجه به مزایای فراوان این فن‌آوری

می‌توان استفاده از آن برای تشخیص دقیق‌تر و کامل‌تر نحوه‌ی اثر نماتدهای انگل گیاهان بر بیان ژن‌های گیاهان میزبان، برای یافتن روش مناسب کاهش اثر آن‌ها را **پیشنهاد** کرد.

References منابع

۱. قره‌یاضی ب.، نقوی م. و حسینی سالکده ق. ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی. چاپ سوم، دانشگاه تهران، ۳۴۰ ص.

2. Alkharouf N. W., Klink V. P., Chouikha I.B., Beard H. S., MacDonald M. H., Meyer S., Knap H. T., Khan R. & Matthews B. F. 2006. Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta* 224:838-852.
3. Chou C. C., Chen C. H., Lee T. T. & Peck K. 2004. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Research* 32:e99-e99.
4. Fuller V. L., Lilley C. J., Atkinson H. J. & Urwin P. E. 2007. Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology* 8:595-609.
5. Hammes U. Z., Nielsen E., Honaas L. A., Taylor C. G. & Schachtman D. P. 2006. AtCAT6, a sink-tissuelocalized transporter for essential amino acids in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 48:414-426.
6. Hermsmeier D., Hart J. K., Byzova M., Rodermel S. R. & Baum T. J. 2000. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infested roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:309-315.
7. Hobman J. L., Jones A. & Constantinidou C. 2007. Introduction to microarray technology. Pp. 1-52. *In*: F. Falciani (ed.). Microarray technology through applications. Taylor & Francis Group, New York.
8. Ithal N., Recknor J., Bettleton D., Maier T., Baum T. J. & Mitchum M. G. 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:510-525.
9. Jaccoud D., Peng K., Feinstein D. & Kilian A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29: e25-e25.

10. Jammes F., Lecomte P., Almeida-Engler J., Bitton F., Martin-Magniette M., Renou J. P., Abad P. & Favery B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44:447-458.
11. Khan R., Alkharouf N., Beard H., Macdonald M., Chouikha I., Meyer S., Grefenstette 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.
12. Klink V. P., Hosseini P., Matsye P. D., Alkharouf N. W. & Matthews B. F. 2010. Syncytium gene expression in *Glycine max* [PI 88788] roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:176-193.
13. Lashkari D. A., DeRisi J. L., McCusker J. H., Namath A. F., Gentile C., Hwang S. Y., Brown P. O. & Davis R. W. 1997. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:13057-13062.
14. Lausted C. Dahl T., Warren C., King K., Smith K., Johnson M. & Lasky S. R. 2004. A fast, flexible, open-source, inkjet oligonucleotide synthesizer and microarrayer. *Genome Bilogy* 5:R58.
15. Li L., Fester T., Taylor C. G. 2008. Transcriptomic analysis of nematode infestation. *Plant Cell Monographs* doi: 10.1007/7089_2008_36.
16. Mazarei M., Puthoff D. P., Hart J. K., Rodermel S. R. & Baum T. J. 2002. Identification and characterization of a soybean ethylene-responsive element-binding protein gene whose mRNA expression change s during soybean cyst nematode infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:577-586.
17. Niebel A., Heungens K., Barthels N., Inze D., Montagu M. V. & Gheysen G. 1995. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:371-378.
18. Passardi F., Penel C. & Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Sciences* 9:534-540.
19. Puthoff D., Nettleton D., Rodermel S. R. & Baum T. J. 2003. Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analysis of microarray expression profiles. *The Plant Journal* 33:911-921.
20. Ramsay K., Wang Z. & Jones M. G. K. 2004. Using Laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant-cells induced by root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology* 5:587-592.

21. Schaff J. E., Nielsen D. M., Smith C. P., Scholl E. H. & Bird D. M. 2007. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiology* 144:1079-1092.
22. Schena M., Shalon D., Brown P. O. & Davis R. W. 1995. Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary cDNA microarray. *Science* 270:467-470.
23. Wilson M. A., Bird D. M. & van der Knaap E. 1994. A comprehensive subtractive cDNA cloning approach to identify nematode induced transcripts in tomato. *Phytopathology* 84:299-302.
24. Wubben M. J. E., Su H., Rodermel S. R. & Baum T. J. 2001. Susceptibility to the sugar beet cyst nematode in modulated by ethylene signal transduction in *Arabidopsis thanliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:1206-1212.

Application of Microarray Technology in Plant Nematology

HABIBALLAH CHAREHGANI✉
Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture,
Yasouj University, Yasouj, Iran
(✉Corresponding author, E.mail: habib.charegani@gmail.com)

Received: 11.07.2015 Accepted: 09.02.2016

Charehgani H. 2016. Application of microarray technology in plant nematology. *Plant Pathology Science* 5(1):76-89.

Abstract

During a compatible interaction, root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) induce the root cells dedifferentiation into multinucleate feeding cells, known as giant cells. Hyperplasia and hypertrophy of the cells surrounding the head of nematode lead to the formation of a root gall. Different studies showed that the transformation of root cells into hypertrophied feeding structures, with unique morphology and functions, require some changes in the expression of a large number of genes. Previous approaches, based on differential gene expression between healthy and infected plants, analyses of known candidate genes by promoter GUS fusion or in situ hybridization and promoter trap strategies, have resulted in the characterization of about 50 genes of plant that are up regulated and 10 genes that are down regulated in giant cells. Microarray technology makes it possible to generate large-scale information about patterns of gene expression during plant–nematode interactions. A DNA microarray is a collection of microscopic DNA spots attached to a solid surface. Each DNA spot contains 10^{-12} moles of a specific DNA sequence, which are known as probes. These can be a short section of a gene or other DNA element that are used to hybridize a cDNA or cRNA sample that called as target. Probe-target hybridization is usually detected by detection of fluorophore or silver labeled targets.

Key words: Microarray, Gene, Plant, Nematode, *Meloidogyne*