کاربرد ژنتیک معکوس در بیماری‌شناسی گیاهی

The application of reverse genetics in plant pathology

جلال غلام نژاد[1]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۸

چکیده

کاهش هزینه‌های توالی یابی ژنوم شناسایی توالی ژنوم تعداد زیادی از موجودات زنده را امکان‌پذیر نموده، ولی عملکرد تمامی ژن‌های توالی‌یابی شده مشخص نشده است. علی‌رغم این‌که با استفاده از دانش ژنتیک مقایسه‌ای و بیوانفورماتیک بررسی در مورد عملکرد ژن‌های تعیین توالی شده میسر شده است، ولی تفسیر فرآیند این ژن‌ها در موجودات به عنوان یک چالش همچنان مطرح است. در همین راستا، توالی‌یابی ژنوم تعداد زیادی از بیمارگرهای قارچی گیاهی و همچنین اامیست‌ها انجام شده است، ولی مشکل اساسی در این مورد، تبدیل این اطلاعات به اطلاعات عملکردی است. روش‌هایی که در علم ژنتیک معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل تخریب/جابجایی ژن‌های هدف، خاموشی ژن‌ها، جهش‌های درون جایگیر و هدف قرار دادن جراحات موضعی القا شده در ژنوم می‌شوند، که با کمک آن‌ها درک عملکرد ژن‌های بیمارگرهای قارچی و اامیستی گیاهی ممکن می‌شود. در این مقاله روش‌های که برای مطالعات ژنتیک معکوس در مورد بیمارگرهای قارچی و اامیستی در گیاهان به کار رفته است، معرفی شده است.

واژگان کلیدی: ژنتیک معکوس، بیماری‌شناسی گیاهی، توالی‌یابی

۱- استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

مقدمه

علم ژنتیک در دهه ۱۸۶۰ میلادی به وسیله مندل پایه‌گذاری شد (Griffiths *et al*., 2000). کشف ساختار دو رشته‌ای دی.ان.ای به وسیله واتسون و کریک، توالی‌یابی نوکلئوتیدها به وسیله سنگر و اختراع فرایند پی.سی.آر به وسیلهٔ مولیس فرایندهایی بودند که باعث ایجاد انقلابی در علم ژنتیک شدند. پیشرفت‌هایی که در زمینه توالی‌یابی به وجود آمده است باعث ایجاد انبوهی از اطلاعات ژنتیکی (توالی‌های موجودات) شد، و این امروزه اطلاعات در مورد موجودات زیادی از جمله بیمارگرهای گیاهی وجود دارد (Saiki *et al*., 1985). روش‌های مورد استفاده برای بررسی‌های ژنتیکی روز به روز در حال گسترش هستند؛ یکی از این روش‌ها که با استفاده از آن می‌توان به عملکرد بسیاری از ژن‌ها پی برد، ژنتیک معکوس (Reverse genetics) است. با ظهور دانش زیست‌شناسی مولکولی، عملکرد بسیاری از ژن‌ها با مطالعه فنوتیپ ژن‌های جهش یافته (Forward genetics) تا حدی مشخص می‌شد و سر نخی از عملکرد ژن مورد نظر به دست می‌آمد. اما با ظهور روش تعیین توالی دی.ان.ای در مقیاس گسترده، هزاران ژن در موجودات گوناگون با عملکرد نامشخص شناسایی شدند. امروزه با استفاده از دانش ژنتیک معکوس عملکرد بسیاری از ژن‌های توالی یافته، مشخص شده است. در حال حاضر، توالی بسیاری از ژن‌های موجودات زنده شناخته شده است، اما فنوتیپ این توالی‌ها اغلب ناشناخته مانده‌اند. بنابراین راهکارهای ژنتیک معکوس مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، البته این راهکارها کاربرد مشابهی در همه موجودات ندارد. ژنتیک معکوس روشی برای کشف عملکرد ژن‌هایی است که به وسیله تکنولوژی توالی‌یابی دی.ان.ای (DNA sequencing) رمزگشایی شده‌اند. در این روش، عملکرد ژن‌ها، در موجودات در شرایط عدم آگاهی از عملکرد مورد بررسی قرار می‌گیرد. در گذشته تحقیقات در این زمینه با مطالعهٔ فنوتیپ‌های افراد جهش یافته صورت می‌گرفت؛ ولی امروزه پژوهشگران قادرند با پیشرفت در علوم زیستی، ویژگی‌های فنوتیپ مربوط به یک ژن خاص را شناسایی کنند (Angaji *et al*., 2010). علم و دانش ژنتیک معکوس دقیقاً در خلاف مسیر ژنتیک سنتی حرکت می‌کند. دانشمندان عملکرد یک ژن ناشناخته را با استفاده از آنالیزهای مولکولی شناسایی می‌کنند. ژنتیک سنتی به دنبال کشف اساس ژنتیکی فنوتیپ است در حالی‌که ژنتیک معکوس به دنبال فنوتیپ‌های مورد انتظاری است که ممکن است از توالی ژنتیکی خاصی حاصل شوند (Arencibia and Carmona, 2007).

تاکنون توالی یابی تعداد زیادی ژنوم قارچی و اامیست‌ها به انجام رسیده است. چالش بزرگ بعدی در زیست‌شناسی مدرن قارچ‌ها و اامیست‌ها، ترجمه اطلاعات زیاد حاصل از توالی‌یابی ژنوم و کاربردی کردن آن در زیست‌شناسی است. ژنتیک معکوس به عنوان ابزاری برای کاربردی کردن اطلاعات حاصل از ژنومیکس است. روش‌های مختلفی برای ژنتیک معکوس به کار گرفته می‌شوند مانند جایگزینی یا تخریب ژن‌های هدف (Targeted gene disruption/replacement)، خاموشی ژن (Gene silencing) جهش‌های درون جایگیر (Insertional mutagenesis)، و هدف قرار دادن ضایعات موضعی القا شده (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) یا TILLING؛ همه موارد ذکر شده کمک بسیار زیادی در درک عمل ژن در مورد قارچ‌ها، اامیست‌ها و موجودات دیگر می‌کند (Chawade *et al*., 2010).

قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و اامیست ها یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده برای تولید محصولات کشاورزی در دنیا هستند. با ظهور روش‌های توالی‌یابی با ظرفیت بالا، شمار ژنوم قارچ‌های توالی‌یابی شده به سرعت در حال افزایش است. در حال حاضر ژنوم تعداد زیادی از قارچ‌ها توالی‌یابی شده است، که از این تعداد ۱۲ عدد مربوط به قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی است، مانند *Botrytis cinerea* (قارچ نکروتروفیک، عامل کپک خاکستری انگور و دیگر میزبان‌های گیاهی)، *Sclerotinia sclerotiorum* (قارچ نکروترفیک، عامل کپک سفید بسیاری از میزبان‌ها، *Fusarium graminearum* (همی‌بیوتروف، عامل head blight غلات) و *Fusarium oxysporum* (همی‌بیوتروف، بیماری پژمردگی گونه‌های گیاهی) (Soanes *et al*., 2007).

در اینجا دو واژه تعریف می‌گردند، ژنومیکس ساختاری و کاربردی. در ژنومیکس ساختاری، توالی‌یابی کل ژنوم یک موجود مشخص می‌شود، و ژنومیکس کاربردی شامل داده‌های تجربی است که در بررسی عملکرد ژن مورد

استفاده قرار می‌گیرد و این اطلاعات به وسیله ژنومیکس ساختاری فراهم آورده می‌شود. با پیشرفت‌های سریع در زمینه ژنومیکس ساختاری، مهم‌ترین مسئله در زمینه ژنومیکس قارچ‌ها و اامیست‌ها، مشخص کردن عملکرد تعداد زیادی از ژن‌هایی است که اطلاعات توالی‌های آن در دسترس باشد (Hieter and Boguski, 1997).

تشابهاتی بین ساختارهای آلاینده و فرایند آلوده‌سازی میزبان، بین قارچ‌های حقیقی و اامیست‌ها وجود دارد. به هر حال، دیواره سلولی اامیست‌ها از سلولز تشکیل شده و مقدار آن نیز بیش‌تر از کیتین است، در حالی‌که کیتین مهم‌ترین ترکیب در دیواره سلولی قارچ‌های حقیقی است. علاوه بر این، هیف اامیست‌ها بدون دیواره است و در فرم رویشی به صورت دیپلوئید دیده می‌شود و این صفات آن‌ها را از قارچ‌های حقیقی متمایز می‌سازد. در بین اامیست‌ها، *Phytophthora*, *Pythium* و *Peronospora* به عنوان معروف‌ترین بیمارگرهای گیاهی با اثرات اقتصادی بسیار زیانبار شناخته شده‌اند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک معکوس راهکارهای آلودگی در مورد بیمارگرهای نکروتیک و همی‌بیوتروفیک را در سطح مولکولی به طور وسیع آشکار کرده است. در مورد انگل‌های اجباری، امکان استفاده از ژنتیک معکوس به علت فقدان روش‌های مناسب مانند عدم توانایی کشت این بیمارگرها در محیط آزمایشگاه، ترانسفورمیشن و روش‌های تخریب ژن برای آنالیزهای مولکولی وجود ندارد. چنین موانعی در کشت آزمایشگاهی این عوامل مانع از تشخیص ژن‌های مسئول در این گونه‌ها شده است (Xue *et al.,* 2002). دستاوردها در زمینه ژنتیک معکوس با افزایش اطلاعات در مورد ژنوم توالی‌یابی شده موجودات در حال افزایش است و روز به روز به تعداد گونه‌های بیمارگر توالی یافته افزوده می‌شود (Wendland, 2003).

در این تحقیق مروری بر پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک معکوس، نظیر جابه‌جایی و تخریب ژن‌های هدف (از بین بردن)، خاموش کردن ژن‌ها (Gene silencing)، جهش‌های درون جایگیر (Insertional mutagenesis) آورده شده است.

۲- دستاوردهای و روش‌های ژنتیک معکوس

۲-۱- جابه‌جایی و تخریب ژن‌های هدف (Targeted gene disruption/replacement)

تیمبرلاک و مارشال (۱۹۸۹) بیان نمودند که یکی از روش‌های بسیار مهم برای پی‌بردن به عملکرد ژن‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی، مطالعه در مورد فنوتیپ‌های موجودات جهش یافته است که جایگاه یا لوکوس ژنومی آن‌ها به وسیله فرایند تخریب (Gene disruption) یا جایگزینی (Gene replacement) به‌وسیله دی.ان.ای غیر همانند یا غیر متجانس، تغییر کرده باشد (Timberlake and Marshall, 1989).

ساختمان دی.ان.ای تلفیقی هدفمند (Targeted integration of DNA)، از طریق نوترکیبی همگن می‌تواند ژن‌ها را با عمل تخریب، پاک کردن یا جا به جایی از بین ببرد. نوترکیبی همگن عبارتست از تبادل متقابل از توالی دی.ان.ای بین دو کروموزم که جایگاه (Locus) ژنی مشابهی دارند (Goffeau, 1994). نوترکیبی همانند یا همگن (homologous) بین ژن هدف و دی.ان.ای تلفیقی دارای آلل جهش یافته انجام گرفته و در نهایت باعث تخریب ژن (knock-out) هدف می‌شود. این روش اولین بار برای مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به منظور کشف نحوه عملکرد ژن‌ها مورد استفاده قرار داده شد و از آن زمان به بعد برای چندین بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار گرفت (Scherer and Davis, 1979). از میان روش‌های مختلف، چهار روش بیش از سایر روش‌ها برای تخریب ژن‌ها و مطالعه عملکرد آن‌ها بکار می‌رود. این چهار روش شامل موارد زیر است:

۱- تخریب ژن مورد نظر به وسیلهٔ یک کاست مقاومت
۲- تغییر بیان ژن‌های مورد نظر به جای از بین بردن ژن‌ها
۳- حذف یا بیان بیش از حد ژن‌ها (Over-expression و Miss-expression)
۴- جایگزینی ژن که مخلوطی از روش دوم و سوم است.

ناکارآمدسازی ژن‌ها (Gene knockout) یا KO روشی کاربردی در زمینه ژنتیک معکوس است که در یک موجود زنده مهندسی شده، باعث ناکارآمد شدن ژن‌ها می‌شود. برای درک عملکرد ناشناخته ژن‌های توالی یافته از روش Gene knock-out استفاده می‌شود، محققان از تفاوت بین موجودات زنده ناکارآمد شده و افراد طبیعی برای پی بردن به این تفاوت‌ها استفاده می‌کنند (Dalmais *et al*., 2008). در حقیقت اصطلاح ناکارآمدسازی ژن‌ها به فرایندی اشاره می‌کند که باعث به وجود آمدن موجودات زنده مهندسی شده و بدون عملکرد خاص می‌شود. این روش ضرورتاً در تقابل با روش Gene Knock-i کارآمدسازی ژنی است. KO کردن همزمان دو ژن در یک موجود زنده را ناکارآمدسازی دوگانه double knockout (DKO) نامیده می‌شود. همچنین واژه‌های Triple knockout (TKO) و Quadruple knockouts (QKO) برای ژن‌های ناکارآمد شده سه تایی و چهارتایی به کار می‌رود (Hayward *et al*., 2011). در مطالعه‌ای که به وسیله کمپر انجام شد با استفاده از روش PCR جهش یافته‌هایی از بیمارگر *Ustilago maydis* با جابه‌جایی ژن‌ها تولید شد. در این روش، ابتدا مناطق '۳ و '۵ از ژن هدف به وسیله PCR تکثیر شدند، و سپس این قطعه به صورت مستقیم به یک کاست ژنی، از طریق دو جایگاه برشی مشخص SfiI چسبانده شد. و در مرحله بعد محصول چسبانیده شده به عنوان الگو برای تکثیر ساختمان جایگزین مورد استفاده قرار گرفت، این الگو می‌تواند به طور مستقیم برای تاریخت‌کردن *U. maydis* استفاده شود (Kamper *et al*., 2004). براکمن و همکاران (۲۰۰۴)، بر اساس روشی که به وسیله کمپر برای تولید جهش یافته‌های *U. maydis* شرح داده شد یک روش تطبیقی در ژنتیک مولکولی را پایه‌گذاری کردند (Brachmann *et al*., 2004). همین محققین یک مجموعه جامع از کاست‌های واردشونده با ساختارهای پایه‌ای برای ژن گزارشگر انتخابی (ژن پروتئین فلوروسنت سبز *gfp*)، یک کاست مقاومت (ژن *hpt*)، و یک کاست پروموتور انتخابی که به وسیله دو جایگاه تشخیص SfiI برای ورود قطعات ژن تکثیر شده به وسیله PCR داشت، را ساختند. با استفاده از این فناوری، دانشمندان دو فرد جهش یافته تولید کردند. در هر دو فرد جهش یافته، پروموتورهای داخلی ژن‌های تولید فرومون (*mfa1*)، بیان ژن *gfp* را هدایت می‌کرد.

Cho و همکاران یک روش برای حداکثر کردن ظرفیت تخریب ژن‌های هدف در مورد قارچ *Alternaria brassicicola* با استفاده از ساختمان‌های خطی حداقل Linear Minimal Element (LME) توسعه دادند. قارچ *A. brassicicola* باعث ایجاد بیماری لکه سیاه روی اعضای خانواده *Brassicaceae* می‌شود و به عنوان یک بیمارگر نکروتروفیک قارچی در مطالعات روی گیاه آرابیدوپسیس مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بهبود بازده تخریب ژن‌های هدف و همچنین تسریع تولید ساختارهای تخریب ژن، دانشمندان از ساختارهای کوچک خطی با عناصر حداقل، یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک با قابلیت شناسایی و یک ژن هدف جزئی استفاده کردند. استفاده از ساختمان‌های LME، اساساً راندمان ناکارآمدسازی ژن‌های هدف را در مقایسه با ساختمان پلاسمید استاندارد بهبود بخشید (Cho *et al*., 2003). تخریب ژن‌های هدف در بسیاری از بیمارگرهای گیاهی مانند *Colletotrichum gloeosporioides*, *M. oryzae* (عامل بیماری آنتراکنوز) *U. maydis*، *A. brassicicola*، *Cochliobolus carbonum* (عامل لکه برگی شمالی ذرت) و *F. graminearum* کاربرد داشت (Wei *et al*., 2004).

در دهه‌های گذشته از بیمارگر *Magnaporthe oryzae* به عنوان مدلی به منظور شفاف‌سازی مکانیسم‌های توسعه‌ای قارچ‌ها، رابطه متقابل گیاهان و قارچ‌ها و پی بردن به بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر استفاده شده است. با استفاده از روش تخریب ژن‌های هدف، عملکرد تعداد زیادی از ژن‌هایی که در بیماری‌زایی قارچ عامل بلاست گیاه برنج درگیر هستند، مشخص شده است. بعضی از این ژن‌های که در بیماری‌زایی نقش دارند عبارتند از ژن *MPG1* (کلاس یک هیدروفوبین)، ژن *PMK1* (که با ژن‌های مخمری Fus3/Kss1 MAP همگن است).

از سال ۱۹۹۰ روش همسانه‌سازی گیت‌وی (Gateway cloning) پایه‌گذاری شد، در زیست‌شناسی مولکولی با استفاده از این روش محققان قطعات دی.ان.ای را وارد پلاسمید می‌کنند. در این روش توالی دی.ان.ای مورد نظر ابتدا در یک ناقل به نام ناقل ورودی همسانه‌سازی می‌شود. پس از ایجاد کلون ورودی (Entry clone) انتقال قطعه دی.ان.ای به ناقل‌های دیگر با واکنش نوترکیبی یک ساعته و بدون استفاده از آنزیم‌های برشی و آنزیم‌های

اتصال‌دهنده لیگاز به راحتی انجام می‌گیرد. واکنش نوترکیبی در حضور پروتئین‌هایی انجام می‌شود که به توالی‌های خاصی (att) متصل می‌شوند و آن‌ها را برش داده و اتصال کوولانسی با دی.ان.ای دارند و موجب نوترکیبی می‌شوند. فناوری گیت‌وی روشی سریع و موثر برای همسانه‌سازی بر اساس خصوصیات نواحی ویژه نوترکیبی باکتریوفاژ لامبدا است (Hartley *et al*., 2000).

این فرایند به وسیله یک مجموعه اختصاصی از توالی‌های نوترکیب، سایت‌های Gateway *att*، و دو مخلوط آنزیمی اختصاصی به نام LR Clonase و BP Clonase انجام می‌شود. روش همسانه‌سازی گیت‌وی به قطعات دی.ان.ای اجازه می‌دهد که بدون کوچک‌ترین آسیبی به ساختمان ژن، درون حامل‌های کلونینگ مختلف وارد شوند. این روش به طور کارآمدی با روش استفاده از آنزیم‌های برشی و لیگاز جایگزین شده است. با استفاده از این روش هر قطعه از دی.ان.ای برای آنالیزهای کاربردی می‌تواند مورد عمل همسانه‌سازی قرار بگیرد. در ابتدا در این روش قطعه دی.ان.ای با استفاده از دو توالی نوترکیب چسبنده وارد قطعه پلاسمید می‌شود، این دو توالی نوترکیب با نام‌های att L1 و att L2 شناخته می‌شوند (Shafran *et al*., 2008). نتایج شگفت‌انگیزی به وسیله این روش کلون‌سازی به دست آمده است، و ژن‌های زیادی از انسان، موش و دیگر جانوران و یا ژن‌هایی که به وسیله روش‌های آزمایشگاهی ساخته شده بودند، کلون شدند (Abe *et al*., 2006). وجود این کاست‌های ژنی در یک پلاسمید استاندارد برای Gateway cloning کمک زیادی در امر انتقال سریع این کاست‌ها به درون پلاسمیدها و آنالیز عملکردی آن‌ها کرده است. این روش برای محققینی که انتقال هزاران قطعه از دی.ان.ای را به درون یک پلاسمید خاص لازم دارند بسیار رهگشا خواهد بود. اولین مرحله در Gateway cloning آماده‌سازی کلون‌های Gateway Entry است. کلون‌های Entry اغلب در دو مرحله ساخته می‌شوند: الف) توالی‌های Gateway attB1 و attB2 به انتهای ۳ و ۵ قطعه مورد نظر وارد می‌شوند و اینکار با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR و تکثیر در آن انجام می‌گیرد. ب) محصولات حاصل از تکثیر در PCR سپس با پلاسمیدهای اختصاصی (Gateway, Donor vectors) و همچنین آنزیم‌های اختصاصی به نام BP Clonase ترکیب می‌شوند. مخلوط آنزیمی ورود توالی att B که شامل محصولات PCR است را به داخل سایت‌های نوترکیبی att P درGateway Donor vector و تولید نوترکیب را کاتالیز می‌کند. این فناوری به محققان اجازه می‌دهد که برای اهداف مختلف مانند بیان ژن‌ها در *Escherichia coli* یا *S. cerevisiae* ، حامل‌های مختلف بسازند، و از یک ناقل که ژن مورد نظر وارد آن می‌شود، استفاده می‌شود. از زمان شروع آنالیزهای ژنومی، تکنولوژی Gateway به طور بسیار وسیعی مشخصات ژن‌ها را آشکار کرده است (Abe *et al*., 2006).

۲-۲- RNA مداخله‌گر (Knock-Down)

آر.ان.ای مداخله‌گر یا به اختصار RNAi فرایند حفاظت شده‌ای طی تکامل موجودات زنده به شمار رفته که به منظور کنترل بیان ژن پس از رونویسی به کار می‌رود. این مکانیسم به صورت طبیعی در اکثر سلول‌های یوکاریوتی شناسایی شده است. این پدیده با تبدیل آر.ان.ای‌های دو رشته‌ای بلند به قطعاتی از آر.ان.ای‌های کوچک دو رشته‌ای به نام آر.ان.ای تداخلی کوچک (siRNA) توسط نوکلئاز ویژه‌ای به نام دایسر (Dicer)، آغاز می‌شود که پس از ترکیب با یک مجموعه پروتئینی خاموشگر القاء شده توسط آر.ان.ای به نام ریسک (RNA-induced silencing complex) یا RISC به ریبونوکلئاز فعالی تبدیل شده که قادر به شناسایی و برش و حذف آر.ان.ای رونوشت از آر.ان.ای پیام‌بر هدف می‌باشد. به نظر می‌رسد این عمل در موجوداتی مانند گیاهان در جهت حفاظت از ژنوم باشد. مطالعات اخیر حاکی از وجود پدیده مشابهی در سلول‌های پستانداران می‌باشد. اخیراً با ایجاد مولکول‌های ساختگی آر.ان.ای کوچک مداخله‌گر (siRNA) و بیان آن توسط ناقل های مناسب راه تازه‌ای برای کنترل بیان ژن‌ها و نیز درمان سرطان‌ها و مبارزه با آلودگی‌های ویروسی و ژن درمانی به روی بشر گشوده شده است. که می‌تواند جایگزین روش‌های آنتی‌سنس و حذف ژنی گردد. تکنولوژی آر.ان.ای مداخله‌گر (interference RNA) -RNAi در خاموشی ژن‌ها (که در گیاهان خاموشی ژن‌ها بعد از نسخه‌برداری (post-transcriptional gene silencing) و در حیوانات آر.ان.ای مداخله‌گر خوانده می‌شود، یکی دیگر از راه‌کارهای مورد استفاده در ژنتیک‌معکوس است. خاموشی

اختصاصی بیان ژن‌ها توسط فرآیند تداخل آر.ان.ای مداخله‌گر interference یا RNAi در واقع یکی از مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن می‌باشد که در سطح پس از نسخه‌برداری در سلول‌های یوکاریوتی اعمال می‌شود. این پدیده توسط مولکول‌های دو رشته‌ای RNA بنام مولکول‌های آر.ان.ای مداخله‌گرکوچک (small interfering RNA) یا siRNA انجام می‌شود. آر.ان.ای مداخله‌گر با استفاده از آر.ان.ای دو رشته‌ای و با از بین بردن آر.ان.ای پیامبر متجانس خود باعث کاهش و یا افزایش یافتن بیان ژن‌ها می‌شود. آر.ان.ای مداخله‌گر کوچک از لحاظ تکاملی در میان موجودات یوکاریوت حفاظت شده است و به نظر می‌رسد که جهت حفاظت ژنوم در مقابل تهدیدات ژن‌های خارجی نظیر ژن‌های ویروسی، ترانس ژن‌ها و همچنین ژن‌های داخلی نظیر عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون‌ها به کار می‌رود. علاوه بر این، فرآیند تداخل آر.ان.ای در برنامه‌های سلولی جهت تنظیم بیان ژن‌ها و کنترل رشد و نمو سلولی نقش دارد (Hannon, 2002).

آر.ان.ای مداخله‌گر بدون این‌که باعث ایجاد جهش در دی.ان.ای شود باعث ناکارآمدسازی اختصاصی ژن مورد نظر می‌شود. این موضوع اولین بار در نماتد *Caenorhabditis elegans* در واکنش به آر.ان.ای دو رشته‌ای کشف شد. در این نماتد، آر.ان.ای مداخله‌گر به طور گسترده در بیان بیش‌تر ژن‌های موجود در ژنوم دخیل بود. نحوه عمل آر.ان.ای مداخله‌گر در درون سلول با تخریب آر.ان.ای پیامبر انجام می‌شود. محققین با کشف آر.ان.ای مداخله‌گر و سایر اجزای داخل سلولی مانند پروتئین‌های دایسر و کمپلکس ریسک (RISC) توانستند از این روش برای knock-down کردن ژن‌ها استفاده کنند (Kadotani *et al*., 2003).

تا کنون سه شکل از فرآیند تداخل آر.ان.ای (آر.ان.ای مداخله‌گر) که از لحاظ فنوتیپی متفاوت ولی از جهت مکانیسم عمل یکسان و مشابه‌اند در یوکاریوت‌ها شناسایی شده است. این اشکال شامل هم‌سرکوبی (Cosuppression) یا خاموش شدن ژن پس از نسخه‌برداری (Post-Transcriptional Gene Silencing) در گیاهان، فرونشانی ژن‌ها (Quelling) در قارچ‌ها و تداخل (آر.ان.ای مداخله‌گر) یا RNAi در مورد جانوران می‌باشد. کشف قطعی پدیده تداخل آر.ان.ای زمانی صورت گرفت که فایر و ملو در پی‌یافتن دلیل خاموشی غیر منتظره ناشی از حضور رشته آر.ان.ای (sense RNA) بودند و در پی آن در سال ۱۹۹۸ نقش حیاتی مولکول آر.ان.ای دو رشته‌ای در خاموش شدن اختصاصی توالی ژن‌ها در نماتد *C. elegans* تشخیص داده شد (DeBacker *et al.,* 2002). فایر و همکارانش موفق به اثبات این موضوع شدند که به هنگام هدف قرار دادن اختصاصی نسخه آر.ان.ای پیام‌بر یک ژن در نماتد *C. elegans*، تزریق مولکول‌های آر.ان.ای دو رشته‌ای قادر خواهد بود حداقل تا ده برابر اثر خاموشی قوی‌تری را در مقایسه با مولکول‌های آر.ان.ای سنس (senseRNA) و یا آر.ان.ای آنتی‌سنس (antisense RNA) به تنهایی القا کند. این‌طور نتیجه‌گیری شد که تزریق آر.ان.ای دو رشته‌ای اختصاصی با منشا خارجی به بدن نماتد به گونه‌ای بسیار کارآمد سبب پاسخ خاموشی اختصاصی ژن هدف در بدن این موجود می‌شود. این پدیده در دیگر موجودات یوکاریوتی اعم از جانوران، گیاهان و انسان به خوبی مورد مطالعه قرار گرفت و سازوکارهای آن شناخته شده است. در سال ۲۰۰۲، زمانی که مجله Science کشف پدیده تداخل آر.ان.ای را بزرگ‌ترین پیشرفت علمی سال نامید، محققان دریافتند که این کشف ارزشمند علمی، طی سال‌های آینده چهره تحقیقات زیست‌شناسی پزشکی را متحول خواهد ساخت (Whisson *et al*., 2005). استفاده از آر.ان. ای مداخله‌گر برای خاموشی ژن‌هایی که بیان آن‌ها در سطح بعد از نسخه‌برداری کاهش می‌یابد، در بیمارگرهایی که از نظر اقتصادی ارزش زیادی دارند مانند *M. oryzae* و *P. infestans* مورد بررسی قرار گرفته است (Latijnhouwers *et al*., 2004).

آر.ان.ای مداخله‌گر نه تنها فقط یک ابزار مهم برای شفاف‌سازی عمل بسیار از ژن‌های ناشناخته است بلکه برای شناسایی ژن‌های ضروری در رشد بیمارگرهای گیاهی و بیماری‌زایی هم استفاده می‌شود.

کادوتانی و همکاران آنالیزی سیستماتیک از خاموشی آر.ان.ای (RNA silencing) در قارچ عامل بلاست *M. oryzae* با استفاده از بیان ژن پروتئین فلورسنس سبز افزایشی (eGFP) به عنوان یک گزارشگر انجام دادند. آن‌ها دریافتند که تجمع eGFP mRNA در موجودات تراریخت خاموش شده به‌طور مستقیم کاهش یافته است. علاوه بر این، باید به این نکته توجه نمود که آر.ان.ای‌های کوچک مداخله‌گر فقط در موجودات تراریخت خاموش‌شده وجود

داشتند. این نتایج نشان داد که خاموشی بیان آر.ان.ای در بیمارگر *M. oryzae* رخ می‌دهد و با استفاده از این روش می‌توان ژنوم قارچ را به صورت عملی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد (Kadotani *et al*., 2003). آخیرو و همکاران کاربرد این روش در خاموشی ژن را به عنوان یک دستاورد مفید در زمینه ژنتیک معکوس برای قارچ *Bipolaris oryzae* نشان دادند؛ این قارچ باعث بیماری لکه قهوه‌ای در برنج می‌شود (Akihiro *et al*., 2007). ژن پلی‌کتیدسینتاز (*PKS1*) باعث ساخته شدن ملانین در قارچ‌ها می‌شود، این ژن در فرایند خاموشی ژن‌ها به عنوان یک مارکر خوب مورد بررسی قرار گرفت. آر.ان.ای کوچک سنجاق سری کدکننده ناقل خاموشی (hpRNA) از قطعه PKS1 ساخته شد و وارد دی.ان.ای ژنومی *B. oryzae* شد (Nguyen *et al*., 2008).

مزیت روش مداخله در ژن‌ها این است که به اطلاعات نسبتاً کمی از توالی ژن‌ها نیاز دارد. این یک مزیت مهم برای بیمارگرهای گیاهی است که اطلاعات کمی از توالی ژنوم آن‌ها در اختیار است. از آن‌جایی که آر.ان.ای مداخله‌گر در سطح آر.ان.ای پیام‌بر مؤثر واقع می‌شود، در نتیجه راندمان آن با حضور نوکلئوتیدهای تراریخت شده یا ژن‌ها با تعداد نسخه بالا (multicopy) مربوط به آنیوپلوئیدی به خطر نمی‌افتد. آر.ان.ای مداخله‌گر باعث کاهش جزئی در بیان ژن‌ها می‌شود. کاهش اندک در بیان ژن‌ها تأثیر زیادی در بیان کلی ژن‌ها و متعاقب آن ساخت پروتئین به وسیله سلول ندارد (Nguyen *et al*., 2008).

یکی از معایب روش مداخله knock-down ژن‌ها این است که نظر به کوتاه بودن توالی مورد نیاز، ممکن است ژن‌های غیر هدف را خاموش کند و لذا نسبتاً غیر اختصاصی است. آزمون برای امکان اثرات خاموش کردن ژن هدف برای گونه‌های بیمارگر گیاهی‌ای که توالی کل ژنوم آن‌ها موجود است ساده‌تر است اما برای آن‌هایی که توالی آن مشخص نیست مشکل‌تر است (Weld *et al*., 2006).

۲-۳- جهش‌های درون جایگیر (Insertional Mutagenesis)

جهش‌هایی وجود دارند که با وارد کردن یک و یا تعداد بیش‌تر باز در دی.ان.ای، باعث جهش می‌شود. این پدیده ممکن است به صورت طبیعی رخ دهد، که در آن‌صورت با کمک ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها اتفاق می‌افتد و همچنین می‌تواند به صورت مصنوعی در آزمایشگاه به وقوع پیوندد. این روش نیز برای مطالعه عمل ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک ترانسپوزون مانند P-element در *Drosophila melanogaster* می‌تواند به نقاط مختلف در طول ژنوم موجود مورد مطالعه متصل شود. جهش یافته‌هایی که با این روش تولید می‌شوند از طریق فنوتیپ غیر عادی شان مورد شناسایی قرار می‌گیرند. در صورت ورود فنوتیپ غیرعادی، اینطور فرض می‌شود که ترانسپوزون به ژن مسئول در فنوتیپ وارده شده است و از آن‌جایی که توالی ترانسپوزون‌ها شناخته شده است، می‌توان ژن مورد نظر را شناسایی کرد. البته با توالی‌یابی کل ژنوم و جستجوی توالی مورد نظر و همچنین با استفاده از PCR می‌توان قطعه مورد نظر را تکثیر نمود (Brown and Holden, 1998).

جهش‌های درون جایگیر یک ابزار بسیار قوی برای تشریح مکانیسم‌های مولکولی بسیاری از فرایندهای ژنتیکی، مانند بیمارگرهای گیاهی، است. مهم‌ترین فایده این روش این است که نیازی به اطلاعات قبلی از ژنوم ندارد. بنابراین می‌تواند برای بیمارگرهای گیاهی فاقد توالی ژنومی به کار رود. فناوری تعیین توالی به صورت سنتی با استفاده از جهش‌زاهای شیمیایی و همچنین اشعه ماورا بنفش به دست می‌آمدند که اطلاعات زیادی را در مورد توسعه بیمارگر و همچنین بیماری‌زایی آن‌ها فراهم نمی‌کرد. این مواد جهش‌زا به اغلب باعث حذف و یا جانشینی در نوکلئوتیدها می‌شوند که این عمل می‌تواند باعث عدم‌کارایی یا تغییر در عملکرد ژن شود، و اختصاصی نبودن این روش‌ها باعث بروز جهش‌های متعدد در ژنوم می‌شود (Mullins *et al*., 2001).

با استفاده از تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی بیش‌تر روی استرین‌های جهش یافته، جداسازی ژن‌های موتانت با استفاده از کتابخانه ژنومی دی.ان.ای و مقایسه با سویه‌های طبیعی، انجام شد. وجود نشانگرهای قابل انتخاب در دی.ان.ای تراریخت می‌تواند برای پیدا کردن رابطه بین ژن وارد شده و فنوتیپ مورد مشاهده، به‌کار رود که نتیجه این فرایند یافتن آلل‌های جهش یافته است (Michielse *et al*., 2005).

جهش‌زاهای وارداتی به وسیله ای.تی.ام.تی (ATMT) در سال‌های اخیر بنیان‌گذاری شده است. در قارچ‌های رشته‌ای، تراریخت‌سازی با دی.ان.ای که با ژنوم قارچی شباهت ندارد و در نتیجه وارد کردن یک دی.ان.ای نامتجانس به ژنوم قارچی این امکان را می‌دهد که با استفاده از دی.ان.ای دستکاری شده به عنوان یک ابزار برای جهش‌های درون جایگیر و تخریب ژن استفاده کرد و در نهایت به مطالعه بیماری‌ها در گیاه کمک کند. باکتری *Agrobacterium tumefaciens* یک باکتری بیماری‌زای گیاهی است که باعث ایجاد تومورهایی در گیاهان به وسیله انتقال قسمتی از دی.ان.ای می‌شود، تی- دی.ان.ای (Transfer DNA) و این قطعه بر روی پلاسمید القاکننده تومور (tumor inducing) واقع شده است و این کار به واسطه سیستم ترشحی نوع چهار انجام می‌گیرد (Michielse *et al*., 2008).

تی-دی.ان.ای در درون میزبان، هسته سلول گیاه میزبان را مورد هدف قرار می‌دهد و به صورت تصادفی با ژنوم میزبان اختلاط پیدا می‌کند. توصیف کامل ای.تی.ام.تی از دامنه این تحقیق خارج است، و برای توضیح دقیق‌تر در مورد ای.تی.ام.تی خوانندگان را به به مقاله Michielse و همکاران ارجاع می‌دهیم (Rolland *et al*., 2003). ای.تی.ام.تی به طور گسترده برای transforming و تراریختگی تعداد زیادی از بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد مانند *Botrytis cinerea*، *Colletotrichum* spp.، *Fusarium* spp. (Covert *et al*., 2001)، *Leptosphaeria* spp.، *Mycosphaerella graminicola*، *Venturia inaequalis* و *Pythium ultimum* (Vijn and Govers, 2001). اخیراً، Jeon و همکاران از طریق ای.تی.ام.تی پژوهشی در زمینه جهش‌های درون جایگیر در مقیاس بزرگ را بر روی قارچ *M. oryzae* strain KJ201 و برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی انجام دادند. آن‌ها تعداد ۲۱۰۷۰ موتانت به دست آوردند که در مقابل آنتی‌بیوتیک هیگرومیسین (hygromycin) مقاوم بودند، و تی-دی.ان.ای وارد آن‌ها شده بود. تخمین زده شد که بیش از ۸۰ درصد از موتانت‌ها، یک تک رونوشت از تی-دی.ان.ای وارد شده به ژنوم را داشته باشند. سپس تراریخت‌ها بر اساس از دست دادن هفت صفت فنوتیپی مورد غربال‌گری قرار گرفتند، این صفات شامل رشد قارچ، وجود رنگدانه‌های‌رنگی، کنیدی‌زایی، مورفولوژی کنیدیوم، جوانه‌زنی کنیدیایی، تشکیل آپروسوریوم، و بیماری‌زایی بودند. روش ای.تی.ام.تی چندین مزیت نسبت به روش‌های قدیمی مانند ترانسفورمیشن CaCl2/PEG-mediated، ترانسفورمیشن بواسطه استات لیتیم، بمباران ذرات و الکتروپوریشن دارد (Mullins *et al*., 2001).

مزیت اصلی روش ای.تی.ام.تی از دیگر روش‌های ترانسفورمیشن سنتی تنوع آن در انتخاب نوع موجود برای شروع عمل ترانسفورماسیون است. سلول‌های کشنده، نظیر کنیدیوم قارچ‌ها می‌توانند به عنوان موجودات کشنده مورد استفاده قرار بگیرند، در نتیجه حذف کردن دیواره باعث تولید پروتوپلاست‌ها می‌شود. نسبت به روش‌هایی که در بالا ذکر شد دارای کارایی بیش‌تری است. استفاده از تی-دی.ان.ای یک روش کارآمد برای نوترکیبی متجانس است، که باعث تکرار بالای ناکارآمدسازی ژن می‌گردد. مزیت مهم دیگر آن تولید درصد بالایی از ترانسفورمانت‌ها با یک نسخه از دی.ان.ای وارد شده در ژنوم است که باعث تسهیل در جداسازی ژن‌های هدف از یکدیگر می‌گردد (Michielse *et al*., 2004).

۲-۴- تیلینگ یا Tilling (هدف قرار دادن ضایعات موضعی القا شده)

روش تیلینگ یک دهه پیش به عنوان جایگزینی برای جهش‌های درون جایگیر ابداع گردید. مهم‌ترین مزیت روش تیلینگ به عنوان یک راهکار ژنتیک معکوس این است که می‌توان آن را در هر گونه گیاهی صرف نظر از اندازه ژنوم، سطح پلوئیدی یا روش تکثیر به کار برد. همچنین راهی برای بررسی ژن هدف در هر گیاهی بدون داشتن دانش اولیه درباره محصول ژن می‌باشد که در ژنومیکس کارکردی از اهمیت بالایی برخوردار است. پروتکل تیلینگ فراوانی بالایی از جهش‌های نقطه‌ای را ایجاد می‌کند که به طور تصادفی در ژنوم توزیع شده‌اند. پتانسیل بالای جهش‌زایی مواد شیمیایی برای ایجاد نرخ بالای جایگزینی نوکلئوتیدی به وسیله تراکم بالای جهش‌های گزارش شده برای جمعیت‌های تیلینگ در گونه‌های مختلف گیاهی به اثبات رسیده است. پیشرفت‌های اخیر در تیلینگ مدیون

ابزارهای بیوانفورماتیک، روش‌های جدید شناسایی جهش از جمله اندونوکلئازهای حساس و خاص نوکلئوتیدهای جفت ناجو (mismatch) و کشف جایگزین‌های متنوع برای غربالگری LI-COR و پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) با استفاده از فن‌آوری‌های نسل جدید توالی‌یابی است. راهکار تیلینگ کاربردهای فراوانی در ژنومیکس کاربردی دارد. علاوه بـر این، در مطالعات پایه و کاربردی با ایـجاد تغیـیراتی در روش تیلینگ اصلی، روش‌هایی از قبیل اکوتیلیـنگ (Ecotilling) یا تیلیـنگ حذفی (Deletion Tilling) ابـداع و مـورد استفـاده قرار گرفته اسـت (Gilchrist and Haughn, 2005).

تعیین توالـی ژنـوم پنـج بیمـارگر گیـاهی عضـو رده Oomycete شامل *Phytophthora sojae*، *P. ramorum*، *P. infestans*، *P. capsici* و *Hyaloperonospora parasitica* انجام شده است. پروژه بعدی در حال انجام، استفاده از اطلاعات این توالی‌ها در عملکردهای بیولوژیکی است. مک کالوم و همکاران (McCallum *et al*., 2000) یک راهکار جدید در زمینه ژنتیک معکوس برای گیاهان، به عنوان ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم را ارائه دادند.

این روش به صورت غیرتراریخته (Non-transgenic) در زمینه ژنتیک معکوس انجام می‌شود و با کمک یک آنزیم اندونوکلئاز مخصوص جهش‌های نقطه‌ای القا شده در ژنوم را شناسایی می‌کنند. در حقیقت این روش مبتنی بر کاوش ژنوم موجود جهش یافته به منظور شناسایی موتاسیون در ژن خاص و شناسایی جایگزینی‌های تک جفت بازی می‌باشد. تیلینگ با بکارگیـری روش‌های تجزیـه و تحلیـل خاص به شناسایی افرادی از جمعیت که دارای جهش‌های تک نوکلئوتیدی هستند، به‌عنوان یک فناوری قدرتمند به‌کار گرفته شود (Lindsay *et al*., 1995).

تیلینگ ابزاری قوی برای مطالعات ژنومیک در بیمارگرهای گیاهی است. لامور و همکاران از روش تیلینگ برای جداسـازی جهش‌های دارای ژن‌های خـاص در بیمارگـر *Phytophthora* spp. استفاده کردند. همین محققین مجموعه‌ای شامل ۲۴۰۰ فرد جهش یافته به وسیله ethylnitrosourea (ENU) برای *P. sojae* تهیه نموده و برای موتاسیون نقطه‌ای القا شده در ژن‌هایی که کدکننده پروتئین‌های نکروز (PsojNIP) و یک فسفولیپاز اختصاصی در *Phytophthora* (PsPXTMPLD) بودند، غربالگری را انجام دادند (Lamour *et al*., 2006).

مهم‌ترین مشکل جهش‌های درون جایگیر نرخ نسبتاً پایین بروز جهش است، که باعث ایجاد مشکل در اتصال ژن‌های اختصاصی می‌گردد. بر خلاف جهش‌های درون جایگیر، مواد شیمیایی جهش‌زا مانند تیمار EMS باعث تکرار جهش بالا بدون برتری آشکار برای مناطق ژنومی خاص می‌گردد. این روش‌ها می‌توانند با تولید آلل‌های زیاد سبب سهولت در کشف فنوتیپ‌های خنثی شوند. اگرچه توسعه روش‌های جهش‌زا عاقبت باعث منسوخ شدن روش تیلینگ خواهد شد، ولی در حال حاضر، این روش به عنوان روشی با حداکثر عملکرد برای تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی در بسیاری از بیمارگرهای گیاهی در نظر گرفته می‌شود.

۳- جمع‌بندی

با توسعهٔ اطلاعات در مورد بانک‌های اطلاعاتی توالی‌یابی ژنوم بیمارگرهای گیاهی، ابزارهای ژنتیک معکوس مانند ناکارآمدسازی، آر.ان.ای مداخله‌گر،ATMT و تیلینگ عملکرد هر ژن را از جایگاه ژنی تا فنوتیپ یا ژنوتیپ به طور کامل مورد بررسی قرار می‌دهند. این روش‌ها برای تشخیص اساس مولکولی اثرات متقابل بیمارگر و گیاه بسیار کارا و مناسب هستند (در هر دو برهمکنش سازگار و ناسازگار). روش ناکارآمدسازی ژن در مورد بیمارگرهای گیاهی که نوترکیبی متجـانس پایینی دارند هنوز به صورت مبهم باقیمانده است. علاوه بر این، خاصیت چند هسته‌ای بودن قارچ‌های بیماری‌زای گیاهان یکی دیگر از مشکلاتی است که کاربرد روش‌های ناکارآمدسازی و جهش‌های درون جایگیر را با مشکل مواجه می‌کند؛ با استفاده از این روش‌ها می‌توان موجودات تراریخت هموکاریون را از موجودات غیر تراریخت جداسازی نمود (Nakayashiki and Nguyen, 2008).

آر.ان.ای مداخله‌گر باعث توقف در بیان ژن‌ها از طریق اختلال در عملکرد آر.ان.ای پیام‌بر می‌شود، این روش ممکن است یک راه حل پیشنهادی برای دو چالش حاصل از روش‌های دیگر باشد. به هر حال، کاربرد آر.ان.ای

مداخله‌گر در قارچ‌های بیمارگر گیاهی روند صعودی داشته و هنوز به صورت کاربردی برای بیمارگرهای گیاهی به کار نمی‌رود. روش نشاندار کردن ژن‌ها (Gene tagging) از روش جهش‌های درون جایگیر برای ایجاد تکرار بالای ترانسفورم کردن استفاده می‌کند و قطعه ورودی را به صورت تصادفی به عنوان یک تک کپی (Single copy) وارد می‌کند. تیلینگ ابزارهای زیادی را برای ژنتیک معکوس فراهم می‌کند، اما با پیشرفت‌هایی که در حال حاضر در زمینه ژنتیک معکوس وجود دارد، ممکن است در آینده نه چندان دور روشی منسوخ قلمداد شود. همه ابزارهای ذکر شده در بالا در مورد ژنتیک معکوس مزایا و معایبی دارند، و ممکن است یکی از این روش‌ها برای یک بیمارگر گیاهی و روش دیگر برای بیمارگر دیگر مفید باشد. بنابراین، یک برنامه‌ریزی دقیق برای دسته‌بندی مزیت‌های ژنتیک معکوس برای آنالیزهای کاربردی در آینده مورد نیاز است (Brown and Holden, 1998).

References

Abe, A., Elegado, E.B., and Sone, T. 2006. Construction of pDESTR, a GATEWAY vector for gene disruption in filamentous fungi, Current Microbiology 52(3): 210–215.

Akihiro, M., Makoto, U., Sakae, A. and Junichi, K. 2007. RNA-mediated gene silencing in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, FEMS Microbiology Letters 269(1): 85–89.

Angaji, S. A., Hedayati, S. S., Hosein poor, R., Samad poor, S., Shiravi, S. and Madani, S. 2010. Application of RNA interference in plants. Plant Omics 3: 77–84.

Arencibia, A. D. and Carmona, E. R. 2007. Sugarcane (*Saccharum* spp.). Pp. 227–235. In: Wang K. (ed.) Agrobacterium Protocols, Humana Press. Vol 2.

Barr, D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms from the perspective of a mycologist. Mycologia 84: 1–11.

Brachmann, A., Onig, J. K, Julius, C. and Feldber, M. 2004. ugge, A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Molecular Genetics and Genomics 272(2): 216–226.

Brown, J. S. and Holden, D. W. 1998. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. Current Opinion in Microbiology 1(4): 390–394.

Chawade, A., Sikora, P., Brautigam, M., Larsson, M., Vivekanand, V., Nakash, M., Chen, T. and Olsson, O. 2010. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and beta-glucan biosynthesis genes. BMC Plant Biology 10: 86.

Cho, Y., Davis, J. and Kim, K. H. 2006. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. Molecular Plant Microbe Interaction 19(1): 7–15.

Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M. H., Briley, A. and Nairn, C. J. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. Mycological Research 105(3): 259–264.

Dalmais, M., Schmidt, J., Signor, C., Moussy, F., Burstin, J., Savois, V., Aubert, G., Brunaud, V. D. E., Oliviera, Y., Guichard, C., Thompson, R. and Bendahmane, A. 2008. UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. Genome Biology 9: R43.

Debacker, M. D., Raponi, M. and Arndt, G. M. 2002. RNA-mediated gene silencing in non-pathogenic and pathogenic fungi. Current Opinion in Microbiology 5(3): 323–329.

Goffeau, A. 1994. Yeast genes in search of functions. Nature 369: 101–102.

Hannon, G. J. 2002. RNA interference. Nature 418: 244–251.

Gilchrist, E. J. and Haughen, G. W. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. Current Opinion in Plant Biology 8(2): 211–215.

Hartley, J. L., Temple, G. F. and Brasch, M. A. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Research 10: 1788-1795.

Hayward, A., Padmanabhan, M. and Dinesh-Kumar, S. P. 2011. Virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other plant species. Pp. 678: 55–63. In: Pereira, A. (ed) Plant reverse genetics: methods and protocols, methods in molecular biology. Humana Press.

Hieter, P. and Boguski, M. 1997. Functional genomics: it's all how you read it. Science 278: 601–602.

Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16(9): 769–776.

Kamper, J. K. 2004. APCR-based systemfor highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Molecular Genetics and Genomics 271(1): 103–110.

Khang, C. H., Park, S. Y., Lee, Y. H. and Kang, S. 2005. A dual selection based, targeted disruption tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. Funagl Genetics and Biology 42(6): 483–492.

Lamour, K. H., Finley, L., Hurtado-Gonzaes, O., Gobena, D., Tierney, M. and Meijer, H. J. G. 2006. Targeted gene mutation in *Phytophthora* spp. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(12): 1359–1367.

Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V. G. A., West, P. and Govers, F. 2004. A Galpha subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans.* Molecular Microbiology 51: 925–936.

Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Cole, R. A., Dubey, J. P. and Blagburn, B. L. 1995. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. Journal of Parasitology 81(2): 313–315.

McCallum, C. M., Comal, L., Greene, E. A. and Henikoff, S. 2000. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiology 123(2): 439–442.

Michielse, C. B., Hookyaas, P. J., Van Den Hondel, C. A. and Ram, A. F. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetics 48(1): 1–17.

Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., Van Den Hondel, C. A. and Ram, A. F. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. Nature Protocols 3(10): 1671–1678.

Michielse, C. B., Ram, A. F. and Van Den Hondel, C. A. 2004. The *Aspergillus nidulans* amdS gene as a marker for the identi-fication of multicopy T-DNA integration events in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. Current Genetics 45(6): 399–403.

Mullins, E. D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D. M. and Kang, S. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: anefficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology* 91(2): 173–180.

Nakayashiki, H. and Nguyen, Q. B. 2008. RNA interference: roles in fungal biology. Current Opinion in Microbiology 11(6): 1-9.

Nguyen, Q. B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y. Mayama, S. and Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. Molecular Microbiology 68(6): 1348–1365.

Rolland, S., Jobic, C., Fevre, M. and Bruel, C. 2003. Agrobacterium-mediated transformation of Botrytis cinerea, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. Current Genetics 44(3): 164–171.

Scherer, S. and Davis, R. W. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(10): 4951–4955.

Shafran, H., Miyara, I., Eshed, R., Prusky, D. and Sherman, A. 2008. Development of new tools for studying gene function in fungi based on the Gateway system. Fungal Genetics and Biology 45(8): 1147–1154.

Soanes, D. M., Richards, T. A. and Talbot, N. J. 2007. Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? The Plant Cell 19(11): 3318–3326.

Vijn, I. and Govers, F. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the oomycete plant pathogen Phytophthora infestans. Molecular Plant Pathology 4(6): 459–467.

Wei, Y. D., Shen, W., Dauk, M., Wang, F., Selvaraj, G. and Zou, J. 2004. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydro-genase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient fromhost plant to fungal pathogen. The Journal of Biological Chemistry 279(1): 429–435.

Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A. and Ridgway, H. J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Research 16(1): 31–44.

Wendland, J. 2003. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. Current Genetics 44: 115–123.

Whisson, S. C., Avrova, A., West, P. V. and Jones, J. T. 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology 6(2): 153–163.

Xue, C., Park, G., Choi, W., Zheng, L. Dean, R. A. and Xu, R. J. 2002. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus. The Plant Cell 14(9): 2107–2119.