

Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları

M. ŞAHİN-ÇEVİK

Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Isparta

Özet: Son zamanlarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler organizmaların genomlarının DNA baz dizilerinin belirlenmesi projelerini hızlandırmış ve aralarında model bitki *Arabidopsis thaliana* ve ekonomik öneme sahip pirinç (*Oryza sativa*) bitkilerinin de bulunduğu birçok organizmanın genomlarının DNA baz dizileri tamamlanmıştır. Veri tabanlarında yer alan ve sürekli artış gösteren bu DNA baz dizisi bilgilerinin fonksiyonel olarak genom düzeyinde analizleri için birtakım metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroarray teknolojisi günümüzde bu amaçla en yaygın olarak kullanılan son derece etkili bir metottur. Bu teknoloji birçok organizmaya ait genom DNA baz dizilerinin tümünü veya bir kısmını içeren genlerin ekspresyon zamanlarını, miktarlarını ve profillerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bitkilerde mikroarray teknolojisi abiyotik ve biyotik stresler, meyve olgunlaşması, sirkadian saati, fitokrom A sinyalleme, tohum gelişmesi ve nitrat asimilasyonunda rol oynayan genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Genomiks, Mikroarray, Gen ekspresyonu

Microarray Technology and Applications to Plants

Abstract: Recent developments in molecular biology accelerated genome sequencing projects and whole genome sequences of many organisms including model plant *Arabidopsis thaliana* and economically important rice plant (*Oryza sativa*) have been completed. Functional analysis of increasing amount of sequence information in the databases requires methods for genome-wide expression analysis. Currently, microarray technology is the most efficient and commonly used method for genome-wide expression analysis. It has been used to determine the expression time, amount and profile of genes from whole or partial genome sequences in genome scale in many organisms. In plants, microarray analysis has been used for expression analysis of genes involved in biotic and abiotic stress responses, fruit ripening, circadian clock, phytochrome A signaling, seed development and nitrate assimilation.

Keywords: Genomics, Microarray, Gene expression

Giriş

Organizmaları oluşturan hücrelerin içerdikleri toplam genetik bilgilerinin tümü genom olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarındaki gelişmeler birçok organizmanın genetik yapıları hakkında moleküler düzeyde bilgi sahibi olunmasına olanak sağlamıştır. 1995 yılında bir bakteri olan *Homophilus influenzae*'nin genomunu belirleyen DNA baz dizileri (1.9×10^6 bp) belirlenmiş ve bütün genetik bilgileri bilinen ilk organizma olarak tarihe geçmiştir [1]. Bunun ardından bir ökaryot olan maya (yeast) *Saccharomyces cerevisiae* genomunun DNA baz dizileri 1996 yılında tamamlanmıştır [2, 3, 4]. Aynı yıl *Archaeobacteria* genomunun DNA baz dizisi [5] ve bundan bir yıl sonrada *Eubacteria* genomunun DNA baz dizisinin [6] tamamlanmasıyla genom dizilimi tamamlanan tek hücreli organizmaların sayısında artış sağlanmıştır.

Daha sonra karmaşık organizmalardan nematod [7] ve *Drosophilla* [8] genomlarının DNA baz dizilerinin tamamlanmasıyla genom analizi yeni bir aşama kaydetmiştir. Bunların ardından insan genomunun DNA baz dizilerinin belirlenmesinin tamamlanıp önce ilk taslağının, daha sonra da son halinin yayınlanmasıyla birlikte genom analizi bilim dünyası yanında topumu da ilgilendiren bir konu haline gelmiştir [9]. İnsan genomunun tamamlanmasından kısa bir süre sonra model

bitki *Arabidopsis thaliana* genomu 2000 yılında tamamlanarak bitkiler de genom DNA baz dizisi belirlenen organizmalar içinde yerini almıştır (10). *Arabidopsis* genomunun DNA baz dizisinin tamamlanmasının ardından 2002 yılında pirinç (*Oryza sativa*) bitkisinin tüm genom baz dizilerinin belirlenmesiyle genom analizlerinin tarımsal üretim alanında kullanımına olanak sağlanmıştır (11). Bütün bu organizmalara ait bilgiler herkesin kullanabileceği bir veri tabanına konulmuş ve bu veri tabanları biyolojik bilimlerde çalışan herkes için çok önemli bir bilgi kaynağını oluşturmaktadır. Organizmaların genomlarına ait bu bilgiler onların sadece baz dizilerine ait bilgileri içermekle kalmayıp aynı zamanda genlerin hücredeki fonksiyonları hakkında da bilgiler vermektedir.

Organizmaların bütün genom bilgilerinin moleküler düzeyde karakterize edilmesi genomiks olarak adlandırılmaktadır. Genomiks sayesinde farklı organizmalara ait genetik bilgiler karşılaştırılmakta ve organizmalar arasındaki benzerlikler evrimsel düzeyde araştırılabilenmekte ve organizmaların ürettikleri proteinlerin çeşitleri, sayıları ve bunların fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Çalışma alanlarına göre genomiks yapısal ve fonksiyonel genomiks olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapısal

genomiks genetik ve fiziksel haritalama ve DNA baz dizilerinin belirlenmesi yöntemleriyle organizmaların genetik bilgilerinin ortaya çıkarılmasını sağlar. Fonksiyonel genomiks ise genlerin ekspresyonunu, biçim, miktar ve zaman açısından genom düzeyinde inceleyerek genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesinin yanında organizma açısından öneminin anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. Yukarıda belirtilen ve genom baz dizileri tamamlanan veya genom dizileri belirlenmekte olan organizmalara ait genetik bilgilerin DNA baz dizisi düzeyinde herkesin ulaşabileceği gen bankaları gibi bir veri tabanında yer alması fonksiyonel genomiksle ilgilenen insanlara çalışma olanağı sunmaktadır. Birçok bilim adamı bu DNA baz dizilerini genomiks yöntemleri kullanarak içerdikleri bilgilerin anlamlarını yorumlamaya çalışmaktadır. Üretilen bu bilgiler insan ve hayvan sağlığı yanında bitki biyolojisi, yetiştirme ve ıslahı konularındaki gelişmelere de ışık tutmaktadır. Fonksiyonel genomiks sayesinde yüzlerce ve hatta binlerce genin hücrede hangi fonksiyonlara sahip oldukları hakkında bilgi sahibi olunabilecek ve bu bilgiler ışığında yeni yöntemler geliştirilerek daha önceden aşlamayan biyolojik sorunlara çözümler üretilecektir (12).

Geçmiş yıllarda bir tek genin ekspresyonu hakkında bilgi sahibi olabilmek için RNA (northern) blot (13), nokta (dot) blot (14), yarı kantatif ve kantatif (semi quantitative ve quantitative) ters yazılım (reverse transcription, RT) polimeraz zincir reaksiyon (polymerase chain reaction, PCR) (15, 16) tekniklerini kullanılmaktaydı. Son on yıldır ise çıkarımlı hibridizasyon (subtractive hibridization) (17), farkımsal gösterim (differential display) (18), seri gen ekspresyon analizleri (serial analysis of gene expression, SAGE) (19), ekspres olan gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi (sequencing of expressed sequence tags, ESTs) (20) teknikleri birçok genin aynı anda farklı koşullarda ekspresyonları hakkında bilgi sağlamıştır. Son zamanlarda ise mikroarray teknolojisi sayesinde binlerce genin farklı koşullardaki ekspresyonlarının aynı anda incelenmesine olanak sağlanmıştır (21).

Mikroarray teknolojisi farklı düzeylerde 20 yıldan beri kullanılan bir teknik (22) olmasına rağmen son zamanlarda kullanılan tamamlayıcı DNA (complementary DNA, cDNA) mikroarray teknolojisiyle bilim dünyasına birçok yenilikler kazandırmıştır. Bu teknolojinin farklı kullanım alanları olmasına rağmen son yıllarda daha çok değişik organizmalarda genomiks çalışmalarında genlerin ekspresyon analizlerinde kullanılmaktadır (23).

Mikroarray, DNA'ların çipler, küçük cam sılayd veya naylon membran üzerinde hibridizasyonla, genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemidir. Genel olarak üç farklı mikroarray çeşidi bulunmaktadır. Bunlar oligonükleotide çipleri, oligonükleotide array ve cDNA arraydir. Oligonükleotide çipler cam üzerine UV-maskeleymesi veya ışıkla aktif olan kimyasal kullanılarak direk olarak sentezlenmiş ve sabitlenmiş kısa oligoları içermektedir. Oligonükleotide arraylar ise önceden sentezlenmiş oligoların cam sılayd veya naylon membran üzerine konmasından oluşur. PCR kullanılarak cDNA veya EST'lerden amplifikasyonla elde

edilen cDNA'ların cam sılayd veya naylon membran üzerine konulmasından da cDNA arraylar oluşur (21, 24).

Mikroarray teknolojisi nükleik asitlerin seçici ve farklılığa dayanan hibridizasyon yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon analiz sonuçlarını kullanır. Bu teknolojiye ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen messenger RNA (mRNA)'lardan RT yöntemi ile cDNA'lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri siyanin 3 (cyanine, Cy3) ve diğeri siyanin 5 (cyanine, Cy5) boyasıyla etiketlenip işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya (dyes) olup farklı emme ve uyarılma (excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşil, üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır ve oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden DNA mikroarrayleriyle hibridizasyon için kullanılır. Genomdaki her bir geni temsil eden bu cDNA parçacıkları hibridizasyon sırasında farklı sinyaller vermektedir. Hibridizasyon sırasında üretilen sinyallerin yoğunluğu örneklerdeki mRNA miktarları ile orantılıdır. Sonra bağlanmayan problemleri uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır. Bu programlar sayesinde hibridizasyon sonucunda mikroarrayden elde edilen sinyaller bilgisayarda birleştirilerek üç farklı renkte görüntülenir. Elde edilen bu görüntüde kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu, sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu, yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade eder. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılıp ve her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde kullanılır (21, 24, 25).

Bitkide mikroarray teknolojisi ilk defa *Arabidopsis*'de yaprak ve kökteki gen ekspresyon profillerini belirlemek için 48 cDNA parçacığını içeren array kullanılarak yapıldı (26). Sonra 1443 *Arabidopsis* geni içeren cDNA mikroarray farklı organ ve gelişme evresinde olan bitkilerde gen ekspresyon profillerini belirlemek için kullanıldı (27). Son yıllarda mikroarray teknolojisi model bitki *Arabidopsis* (28) ve pirinç (29), mısır (30), çilek (31), fasulye (32) gibi tarımsal açıdan önemli olan birçok bitkide, farklı koşullardaki gen ekspresyon profillerini belirlemek için kullanıldı (24, 33).

Gen ekspresyon profilinin mikroarray teknolojisi kullanılarak belirlenmesi çok yaygın bir çalışma şekli olup, hücredeki fonksiyonu bilinmeyen birçok genin fonksiyonlarının belirlenmesini sağlamaktadır.

Mikroarrayden elde edilen gen ekspresyon verileri farklı istatistiksel teknikler kullanılarak hiyerarşik gruplama (hierarchical clustering), ana parça analizi (principal component analysis, PCA) ve kendi kendine organize olan haritalar (self-organizing maps, SOM) genlerin gruplandırılmasında kullanılır. Hiyerarşik gruplama tekniği kullanılarak genler ekspresyonlarına göre önce aşağıdan yukarıya doğru daha sonra da grupların kendi aralarında benzerliklerine göre birleştirilmeleri yapılarak bir soy ağacı elde edilmeleri sağlanır. Bu gruplandırma sayesinde hücrelerin işleyiş mekanizmaları hakkında bilgi sahibi olunurken aynı zamanda hücredeki fonksiyonları bilinmeyen genler hakkında da bilgi edinilir (24).

Son yıllarda birçok organizmanın DNA baz dizileri belirlenmiş olmasına rağmen bu DNA baz dizileri kendi başlarına bir şey ifade etmezler. Mikroarray tekniği sayesinde DNA baz dizileri belli olan genlerin hücredeki fonksiyonları araştırılmaktadır. Bu nedenle mikroarray analizinin sonucunda elde edilen ve farklı gelişme evresinde, farklı koşullarda ve farklı genotiplerde bulunan birçok bitki geni fonksiyonlarına göre gruplandırılmaktadır (33, 34). Örneğin ışııkta ve karanlıkta yetiştirilen *Arabidopsis* bitkilerinde mikroarray çalışması yapıldığında ışııkla yönetilen birçok geni belirlemek mümkün olmaktadır (35, 36). Bu genlerin birçoğu yeni bulunan genler olacağı için daha önce veri tabanında bulunan hiçbir genle benzerlik göstermeyebilir, ama en azından bu genlerin ışııkla yönetilen genler olduğu ve hücrede ışııkla birlikte aktivitelelerini artırıp veya azaldığı hakkında da bilgi sahibi olunur (34).

Bu nedenle mikroarray son yıllarda birçok bilim adamı tarafından bitkilerde abiyotik (37, 38) ve biyotik stresler (39), meyve olgunlaşması (40), sirkadian saati (41), fitokrom A sinyalleme (42), tohum gelişmesi (43) ve nitrat asimilasyonu (44) sırasında aktif olan yada aktivitelelerini azaltan genlerin bulunmasında kullanılmıştır. Buna benzer çalışmalar tüm genom DNA baz dizisi belli olan *Arabidopsis* ve pirinçte kullanılabileceği gibi kısmi genom DNA dizileri belirlenmiş ya da belirlenmekte olan birçok diğer bitkide de uygulanabilecektir. Mikroarrayden elde edilen ekspresyon profillerini onaylamak için bu bilgiler daha sonra hücredeki proteinlerin analizlerinden oluşan proteome'dan elde edilen verilerle karşılaştırılabilir. Mikroarray ve proteome verilerinden elde edilen bilgilerle proteinin hücredeki fonksiyonunun yazılım (transkripsiyon) düzeyinde mi yoksa yazılımdan (transkripsiyondan) sonra olabilecek bir mekanizmayla mı kontrol edildiği belirlenebilir (34).

Mikroarrayden elde edilecek gen ekspresyon profilleri bitki biyolojisinin işleyiş mekanizması hakkında genel bir bilgi verdiğinden dolayı bitki moleküler biyolojisinde çalışan insanların bu konular hakkındaki görüşlerini değiştirerek onların bitkinin büyüme ve gelişmesi sırasında ortaya çıkan problemlerinin çözümü için yeni yöntemler geliştirmelerini sağlayacaktır. Genlerin ekspresyon profillerinin aynı olması bu genlerin fonksiyonlarının aynı olması anlamına gelmeyebilir. Ancak bu genlerin işleyişlerinin aynı genetik kontrol mekanizmasıyla yönetildiği anlamına gelir. Genlerin

benzer ekspresyon profilleri gösterenlerinin belirlenmesinin ardından bu genlerin düzenleyici (regulatory) elementleri, destekleyici (promoter) bölgeleri ve cis elementleride tanımlanabilir. Bunlardan elde edilebilecek sonuçlarla genler yazılım (transkripsiyon) sırasındaki işleyiş mekanizmalarındaki düzenlemelerine göre sınıflandırılabilir (23, 24, 34, 45). *Arabidopsis*'in akşam (karanlık) element motifleri bu şekilde tanımlanmıştır (46).

Maya (yeast) *Saccharomyces cerevisiae* genomunun tamamlanmasının ardından genomu içeren 6200 genle mikroarray çalışması hücre döngüleri (cell cycle) (47) sporların gelişmesi (48), karbon ve azot yoksunlukları (49) gibi farklı koşullarda yapılmıştır (50, 51). Bu tür çalışmalara genom düzeyinde (genome-wide) ekspresyon profilleri denmektedir. Son yıllarda *Arabidopsis* ve pirinç genom baz dizilerinin tamamlanmış olması nedeniyle bu tür çalışmalar bu bitkiler üzerinde de yapılmakta ve farklı organizmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak genom çapında düzenleyici ağlar (genome-wide regulatory networkler) belirlenebilir (52, 53).

Genlerin aktivitelelerini artırılması bitkileri farklı çevresel streslere karşı tutarak veya bitkiler üzerinde farklı genetik metotlar uygulayarak, mutasyonlar yaratmak suretiyle olabilir. Mutasyonlar kimyasal yada etkisizleştirme (knockouts) yöntemleriyle (54), aktivasyon etiketleme (activation tagging) (55), veya genler üzerinde kesip çıkarımlar (deletions) yapılarak (56) yada fiziksel yöntemlerle oluşturulabilir. Değişik yollarla oluşturulan mutasyonların hücrede yarattıkları spesifik etkiler gen ekspresyonlarına bakılarak belirlenebilir. Böylece hücrenin işleyiş mekanizması hakkında bilgiler edinilir (21, 24).

Organizmaların DNA'larındaki farklılık gen ekspresyon profillerine bakılarak elde edilebilir. Böylece türler ve popülasyonlar arasındaki farklılıklar mikroarray yöntemiyle belirlenebilir. DNA'nın tek bazında meydana gelen değişiklikler (single nucleotide polymorphism, SNPs) en çok karşılaşılan genetik varyasyon çeşidi olup mikroarraylerden elde edilen sonuçlarla birçok SNPs belirlemek mümkün olmaktadır (21, 24, 57).

Moleküler biyoloji alanında son yıllarda artarak devam eden gelişmeler bütün organizmalarda moleküler düzeyde genetik bilgi patlamasına yol açmış ve gen bankaları içlerinde bir çok bitkinin de bulunduğu değişik canlıların DNA baz dizileriyle dolmuştur. Her geçen gün artan tüm genom ve kısmi genom dizilerinin fonksiyonel analizleriyle bunların hücrede ne yaptıklarının anlaşılacak değişik organizmalarda biyolojik problemlerin çözümü sağlanabilir. Bunu yapabilmek içinde binlerce genin ekspresyon analiz ve profillerini aynı anda çıkarabilen mikroarray teknolojisinin şu anki haliyle kullanımının yaygınlaştırılması ve daha da geliştirilmesi gerekmektedir. Ülkemizde de bu teknolojinin her alanda olduğu gibi tarımsal problemlerin çözümüne yönelik kullanılması için altyapı oluşturulmalıdır.

Kaynaklar

- [1] Fleischmann R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult C.J., Tomb, J.F., B.A.Dougherty, J.M.Merrick, et al., "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*" Science 269 (1995)496-512
- [2] Hieter P., Basset D.E.J., Valle D., "The yeast genome-a common currency" Nat. Genet. 13 (1996)253-255
- [3] Johnston M., "Genome sequencing: the complete code for a eukaryotic cell" Curr. Biol. 6 (1996) 500-503
- [4] Mewes H.W., Albermann K, Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., Pfeiffer F., Zollner A., "Overview of the yeast genome" Nature 387 (Suppl.) (1997) 7-65
- [5] Bult et al., "Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*" Science 273 (1996) 1058-1073
- [6] Kunst et al., "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*" Nature 390 (1997) 249-256
- [7] Ainscough et al., "Genome Sequence of the Nematode *Caenorhabditis elegans*" A Platform for Investigating Biology. Science 282 (1998) 2012-2018
- [8] Adams et al., "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*" 287 Science (2000) 2185-2195
- [9] Venter et al., "The sequence of the human genome" Science Vol. 291:1 (2001) 304-1351
- [10] Arabidopsis Genome Initiative, "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*" Nature 408(6814) (2000) 796-815
- [11] Yu et al., "A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica)" Science 296 (2002) 79-92
- [12] P.S.Lee, K.H.Lee, "Genomic analysis" Curr. Opin. Biol. 11 (2000) 171-175
- [13] Ca Q.Y.i, Moore G.A., Guy C.L., "An unusual group-2 lea gene family in Citrus responsive to low-temperature" Plant Mol. Biol. 29 (1995) 11-23
- [14] Mraz I., Petrzik K., FranovaHonetslegrova J., Sip M., "Detection of strawberry vein banding virus by polymerase chain reaction and dot blot hybridization" Acta. Virologica. 41 (1997) 241-242
- [15] Sorrell D.A., Marchbank D., McMahon A., Ickinson K., Rogers J.R., Francis, H.J., "A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*" Planta 215 (2002) 518-522
- [16] Massonneau, A., Langlade N., Leon S., Smutny J., Vogt E., Neumann G., and Martinoia E., "Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (*Lupinus albus* L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status" Planta 213 (2001) 534-542
- [17] Choi J.W., Kimi G.B., Huh Y.C., Kwon M.R., Mok I.G., Kim J.W., Lee T.S., Kim S., Im K.H., "Cloning of genes differentially expressed during the initial stage of fruit development in melon (*Cucumis melo* cv. Reticulatus)" Mol Cells. 30;17(2) (2004) 237-41
- [18] Wada Y., Miyamoto K., Kusano T., Sano H., "Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants" Mol Genet Genomics. 271(6) (2004) 658-66
- [19] Quere R., Manchon L., Lejeune M., Clement O., Pierrat F., Bonafoux B., Commes T., Piquema D.I, Marti J., "Mining SAGE data allows large-scale, sensitive screening of antisense transcript expression" Nucleic Acids Res. 23;32(20) (2004) e163
- [20] Dejardin A., Leple J.C., Lesage-Descauses M.C., Costa G., Pilate G., "Expressed sequence tags from poplar wood tissues-a comparative analysis from multiple libraries" Plant Biol. (Stuttg). 6(1) (2004) 55-64
- [21] Moody E.D., "Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression" J. Anim. Sci. 79 (2001)128-135
- [22] Kafatos F.C., Jones C. W., Efstratiadis A., "Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure" Nücl. Acids. Res. 6 (1979) 1541-1552
- [23] Donson J., Fangv, Espiritu-Santo G., Xing W., Salazar A., Miyamoto S., Armendarez V., Volkmoth W., "Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling" Plant Mol. Biol. 48 (2002) 75-97
- [24] Aharoni A., Vorst O., "DNA microarrays for functional plant genomics" Plant Mol. Biol. 48 (2001) 99-118
- [25] Duggan D.J., Bittner M., Chenv, Meltzer P., and Trent J. M., "Expression profiling using cDNA microarrays" Nature Gen. Suppl. 21 (1999) 10- 14
- [26] Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray" Science. 270 (1995) 467- 470
- [27] Ruan Y., Gilmore J., Conner T., "Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays" Plant J. 15 (1998) 821-833

- [28] Lin J.F., Wu S.H., "Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves" *Plant J.* 39(4) (2004) 612-28
- [29] Lan L., Chen W., Lai Y., Suo J., Kong Z., Li C., Lu Y., Zhang Y., Zhao X., Zhang X., Zhang Y., Han B., J.Cheng, Y.Xue, "Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray" *Plant Mol Biol.* 54(4) (2004) 471-87
- [30] Wang H., Miyazaki S., Kawai K., Deyholos M., Galbraith D.W., Bohnert H.J., "Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots" *Plant Mol Biol.* 52(4) (2003) 873-91
- [31] Aharoni A., Keizer L.C., Van Den Broeck H.C., Blanco-Portales R., Munoz-Blanco J., Bois G, Smit P., De Vos R.C., O'Connell A.P., "Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit" *Plant Physiol.* 129(3) (2002)1019-31
- [32] Arimura G., Tashiro K., Kuhara S., Nishioka T., Ozawa R., Takabayashi J., "Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochem Biophys Res Commun*" 22;277(2) (2000) 305-10
- [33] Schaffer R., Landgraf J., M.Perez-Amador, E. Wisman, "Monitoring genome-wide expression in plants" *Curr Opin Biotech.* 11 (2000) 162-167
- [34] Kuhn E., "From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants" *Annals of Botany* 87 (2001) 139-155
- [35] Desprez T.J., Amselem, Caboche M., Hofte H., "Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays" *Plant J.* 14 (1998) 643-652
- [36] Kehoe D., Villand P., Somerville S.C., "DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms" *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 38-44
- [37] Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K., "Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray" *Plant Cell.* 13 (2001) 61-72
- [38] Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozak K.i, Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K., "Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31 (2002) 279-292
- [39] Gibly A., Bonshtien A., Balaji V., Debbie P., Martin G.B., Sessa G., "Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*." *Mol. Plant. Microbe Interact.* 17(11) (2004) 1212-22
- [40] Schwab W., Aharoni A., Raab T., Perez C., Sanz A.G., "Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*)" *Phytochemistry.* 56(5) (2001) 407-15
- [41] Schaffer R., Landgraf J., Accerbi M., Simon V., Larson M., Wisman E., "Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*" *Plant Cell.* 13 (2001) 113-123
- [42] Wang H., Ma L., Habashi J., Li J., Zhao H., Deng X.W., "Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*" *Plant J.* 32(5) (2002) 723-33
- [43] Ogawa M., Hanada A., Yamauchi Y., Kuwahara A., Kamiya Y., Yamaguchi S., "Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination" *Plant Cell.* 15(7) (2003)1591-604
- [44] Wang R., Okamoto M., Xing X., Crawford N.M., "Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism" *Plant Physiol.* 132(2) (2003) 556-67
- [45] Brown P.O., Botstein D., "Exploring the new world of the genome with DNA microarrays" *Nature Gen. Suppl.* 21 (1999) 33-37
- [46] L.Harmer S., B.Hogenesch L., Straume M., Chang H.S., Han B.,Zhu T, Wang X., Kreps J.A., Kay S.A., "Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock" *Science* 290 (2000) 2110-2113
- [47] Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.O., Iyer V.R., Anders K., Eisen M.B., Brown P.O., Botstein D., Futcher B., "Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization" *Mol Biol Cell.* 9 (1998) 3273-3297
- [48] Chu S., DeRisi J., Eisen M., Mulholland J., Botstein D., Brown P.O., Herskowitz I., "The transcriptional program of sporulation in budding yeast" *Science* 282 (1998) 699-705
- [49] Kao C.M., "Functional genomic technologies: creating new paradigms for fundamental and applied biology" *Biotechnol. Prog.* 15 (1999) 304-311
- [50].DeRisi J.L, Iyer V.R., and Brown P.O., "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale" *Science* 278 (1997) 680-686

- [51] Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., Namath A.F., Gentile C., Hwang S.Y., Brown P.O., Davis R.W., gene expression analysis” Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 13057-13062
- [52] Palenchar P.M., Kouranov A., Lejay L.V., Coruzzi G.M., “Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants” Genome Biol. 5(11) (2004) R91
- [53] Wellmer F., Riechmann J.L., Alves-Ferreira M., Meyerowitz E.M., “Genome-wide analysis of spatial gene expression in *Arabidopsis* flowers” Plant Cell. 16(5) (2004) 1314-26
- [54] Wichmann G., Bergelson J., “Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field” Genetics. 166 (2) (2004) 693-706
- “Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and
- [55] Ahad A., Wolf J., Nick P., “Activation-tagged tobacco mutants that are tolerant to antimicrotubular herbicides are cross-resistant to chilling stress” Transgenic Res. 12(5) (2003) 615-29
- [56] Olsson U., Sirijovski N., Hansson M., “Characterization of eight barley *xantha-f* mutants deficient in magnesium chelatase” Plant Physiol Biochem. 42(6) (2004) 557-64
- [57] Bundock P.C., Henry R.J., “Single nucleotide polymorphism, haplotype diversity and recombination in the *Isa* gene of barley” Theor. Appl. Genet. 109 (3) (2004) 543-51