بکارگیری روش های PCR در بیماریهای غلات

حسن زحمتکش [۱]
zahmatkehhassan@uoz.ac.ir
zahmatkehhassan68@gmail.com
مریم اله دو [۲]
maryam.allahdou@uoz.ac.ir
محمود سلوکی [۳]
Mahmood.Solouki@gmail.com
نویسنده مسئول : دانشجوی دکترای، گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل [۱]
استادیار، گروه بیوتکنولوژی ،دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل [۲]
استاد، گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل [۳]

چکیده :

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) یکی از ارکان ژنتیک مولکولی و مهمترین تکنیک عملی برای آزمایشگاههای تحقیقاتی می باشد. PCR ها این توانائی را در اختیار محققان می دهند که با کاهش زمان آزمایش، رویکردهای مبتنی بر DNA را در جهت تشخیص و ردیابی پاتوژنهای گیاهی کشف و توسعه دهند . این تحقیق در زمینه انواع روش های PCR مورد استفاده در بیماریهای غلات می باشد، که ۵ گونه زراعی(ذرت ، گندم ، جو ، برنج، سورگوم) را در زمینه بیماریها و عوامل بیماری در انواع گیاهان زراعی، ریز نمونه های دخیل و روش های PCR استفاده شده ، مورد بررسی قرار می دهیم تا قابلیت های مناسب انواع این روش ها را ارائه کنیم .

کلمات کلیدی : بیماری، روش ، غلات، PCR

مقدمه :

ذرت ، برنج و گندم سه محصول پرمصرف در سراسر جهان ، به ویژه در کشورهای در حال توسعه هستند ، ذرت با کاربرد های گسترده غذایی و صنعتی از غلات اصلی می باشد[۲۱]. ذرت حداقل در ۳۰٪ کالری غذایی بیش از ۴.۵ میلیارد نفر از کشورهای در حال توسعه تأمین می شود و نقش بسزایی در معیشت میلیونها کشاورز دارد [۴۸,۹۱]. جو (*Hordeum vulgare* L. ssp. *Vulgare*، n = 14) عضوی از خانواده Poaceae است. جو پس از ذرت ، برنج و گندم با سهم ۷٪ از تولید جهانی غلات ، چهارمین محصول غلات در جهان محسوب می شود [۶۷]. جو، مناسب برای مناطق خشک سازگار با بارانهای نامنظم و حاصلخیزی ضعیف خاک می باشد [۶۰].

از نظر تولید غلات سورگوم در پشت گندم ، جو ، ذرت و برنج پنجمین محصول غلات در جهان است[۸۲]. در سطح جهانی ، تقریباً نیم میلیارد نفر روزانه به سورگوم اعتماد می کنند و دانه سورگوم و آرد را به عنوان غذای اصلی مصرف می کنند[۵۷,۶۲,۵۹]. شناسایی ارگانیسم های ایجاد کننده بیماری در گیاهان زراعی برای تعیین استراتژی های کنترل مناسب از اهمیت زیادی برخوردار است. این همیشه یک مساله آسان نیست ، به ویژه هنگامی که در میزبان های مختلف از مناطق مختلف جغرافیایی با بیماری های ناآشنایی روبرو می شویم[۸۹].

اختراع واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) توسط سایکی و همکاران در سال ۱۹۸۳ ،[۳۷,۸۳]. یکی از ابتکاری ترین ها و هنوز هم به طور گسترده ای در زمینه علوم استفاده می شود [۹۶]. PCR به یکی از پایه های اصلی استفاده از علوم و سیستم مولکولی در تشخیص و تحقیقات تبدیل شده است [۴۲ ,۶۱]. واکنشPCR تکثیر انتخابی یک ناحیه مورد نظر از مولکول DNA است[۸,۱۰]. برای انجام واکنش PCR، مولکول DNA هدف با آنزیم Taqپلی مراز و دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی و مجموعه ای از نوکلئوتید های فراهم شده مخلوط می گردد [۸]. (PCR) یکی از گسترده ترین و مفید ترین دستورالعمل های بکار گرفته شده در زیست شناسی مولکولی گیاهی می باشد [۳۱]. PCR در یک لوله آزمایش منفرد ، به سادگی و از طریق ترکیب DNA با مجموعه ای از مواد مورد نیاز در لوله آزمایش و قرار دادن آن در ترماسایکلر انجام می شود[۱۵]. در خلال سنتز توسط PCR، محصولات PCR توسط مارکرهای فلئورسانت نشاندار می شود تا در دستگاه توالی یابی کننده خودکار قابل تشخیص باشد[۳۲]. از کاربرد های آن می توان شناسائی حضور یک ارگانیسم بیماریزا در یک نمونه زیستی ، بدست آوردن مقادیر زیادی از توالی DNA ویژه به منظور کلون کردن ، تکثیر پایه های/ ۵ به / ۳ از یک mRNA ویژه و ساخت یک ژن سنتزی نام برد[۷]. نیاز به اطلاعات در مورد توالی هدف تا حد زیادی کاربرد PCR را به عنوان یک ابزار نقشه برداری محدود می کند[۳۳]. استفاده از روش PCR شناسایی گسترده ای از فیتوپلاسما فردی را باعث می شود و عفونت مختلط را در نمونه های جمع آوری شده در مزرعه فراهم می کند. به عنوان مثال ، بکارگیری از ژن های محافظت شده S RNA۱۶ ریبوزومی (rRNA) ، پروتئین ریبوزومی(rp) ، فاکتور طویل(tuf) TU و ژن secY ، فیتوپلاسماها را می توان اساساً شناسایی و طبقه بندی نمود[۱۰۸]. دو نکته کلیدی در استفاده از PCR وجود دارد اول اینکه در این روش DNA تکثیر می شود و می توان با یک نمونه با مقدار کم (به میزان یک مولکول)شروع کرد و مقادیر زیادی از آن را به دست آورد . نکته بعدی این روش به ما حق انتخاب می دهد به این معنا که با تمام ژنوم ارگانیسم شروع می کنیم ولی فقط قسمتی از آن را تکثیر می کنیم ولی فقط قسمتی از آن را تکثیر می کنیم که کد ژن خاصی را دارد. PCR یک تکنیک ساده است که نیازمند میزان کمی مهارت تخصصی می باشد. PCR این امکان را فراهم می کند تا ناحیه ای از DNAرا بدون نیاز به جایگاه برش از قبل تعیین شده تکثیر کنیم [۴].PCR بسیاری از تکنیک هایی را که برای انجام کلون ژن قابل انجام اما مشکل بودند را آسان کرد.این تکنیک ، دامنه آنالیز DNA را افزایش و منجر به کاربردهای جدید برای یافته های بیولوژی مولکولی در زمینه های کشاورزی و بیوتکنولوژی شد[۱۷,۹].

درعفونت های باکتریایی ، قارچی و ویروسی همراه با آلودگی حشرات منجر به بیماری ها و آسیب های گیاهی می شود. پس از شروع علائم بیماری گیاه ، وجود بیماری در گیاهان با استفاده از تکنیک های تشخیص بیماری تأیید می شود. در حال حاضر ، روش های تشخیص بیماری های گیاهی موجود می باشد سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) ، بر اساس پروتئین ها تولید شده توسط پاتوژن و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ، بر اساس توالی های خاص اسید نوکلئیک(DNA) deoxyribose از پاتوژن می باشد[۸۵,۸۶]. روش‌های مرسوم برای شناسایی پاتوژن‌ها(عامل بیماری) اغلب به جداسازی پاتوژن در محیط‌های انتخابی یا از طریق آنالیزهای بیوشیمیایی، شیمیایی و ایمونولوژیکی تکیه می‌کنند. این روشها برای تشخیص وجود عوامل بیماریزای گیاهی اساسی هستند ، اما به روشهای آزمایشگاهی وقت گیر ، نیرو ، و به تخصص طبقه بندی ماهرانه متکی هستند. تکنیک های مبتنی

بر مولکول می توانند بر بسیاری از کاستی های روش های مرسوم غلبه کنند ، به ویژه اگر آنها به روش های واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) متکی باشند. سنجش های مبتنی بر PCR معمولاً خاص تر و بسیار سریعتر از تکنیک های معمولی هستند[۷۳]. به طور کلی ، تکنیک های مولکولی مبتنی بر انواع مختلف تکثیر PCR منجر به تولید سریع ، سریعتر و دقیق تر روش های تشخیص برای شدیدترین عوامل بیماری زای گیاهی می شود که دارای مزایای مهم برای کشاورزی است[۷۹]. چرا تاکنون روش PCR که روشی سریع می باشد جایگزین روش کلون سازی که روش بسیار وقت گیر است نشده باشد ؟ دلیل آن این است که PCR تنها برای قطعاتی از DNA مورد استفاده قرار می گیرد که توالی آن از قبل شناخته شده باشد[۱۰].

۱– انواع روش های PCR:

۱ – ۱: PCR ویژه الل (Allele-specific PCR)

PCR اختصاصی آلل، روشی که تغییرات تک نوکلئوتیدی را در قطعات DNA تشخیص می‌دهد توصیف می کند [۹۰]. ایده اصلی در مورد PCR ویژه الل این است که اگر در انتهای ′۳آغازگر ، یک جفت شدن ناقص وجود داشته باشد ، تکثیر PCRبه صورت چشمگیری کاهش می یابد. بدین منظور آزمون PCR ویژه الل با آخرین باز انتهای ′۳یک آغازگر SNP طراحی می کند.در این آزمون آغازگر دیگر از لحاظ داشتن توالی حفاظت شده چندان دورتر از اغازگر اول نیست[۲۰].

multiplex PC:۲ –۱

آزمایشگاه های تشخیصی استفاده از PCR به دلیل هزینه و گاهی اوقات در دسترس بودن حجم نمونه آزمایش کافی محدود می شود برای غلبه بر این کاستی ها روشی به نام multiplex PCR مطرح می شود. در Multiplex PCR بیش از یک توالی هدف را می توان با گنجاندن بیش از یک جفت پرایمر در واکنش تقویت کرد Multiplex PCR دارای پتانسیل صرفه جویی قابل توجهی در زمان و در آزمایشگاه بدون به خطر انداختن ابزار آزمایش می باشد[۵۵]. برای آنالیزهای کمی ساخته و پرداخته شده است[۹۸]. در Multiplex PCR، کشف تکرارهای توالی ساده و تقویت آنها به عنوان نشانگرهای تشخیصی، هدف ما می باشد[۶۵].این روش یکی از روش های تغییر یافته PCR معمولی است ، در این جفت از چند جفت پرایمر اختصاصی مختلف جهت تکثیر قطعات DNAالگوی مختلف در یک واکنش PCR به طور همزمان استفاده می شود[۱۰].

در Multiplex PCR از چند جفت پرایمر اختصاصی جهت هدف های گوناگون استفاده می شود و امکان شناسائی چند عامل بیماری در یک نمونه به طور همزمان وجود دارد[۱].روشی می باشد که معمولاً برای چندین مناطق هدف DNA در یک واکنش واحد مورد استفاده قرار می گیرد . مالتی پلکس PCR بنابراین راندمان توان عملیاتی را افزایش می دهد .طراحی سنجش‌های PCR مالتی پلکس می‌تواند دشوار باشد زیرا شامل تحلیل‌های محاسباتی گسترده جفت‌های پرایمر برای برهمکنش‌های متقابل است .برای دستیابی به تقویت یکنواخت اهداف، پرایمرها باید طوری طراحی شوند که با کارایی یکسان به اهداف خود متصل شوند[۵۸].

۱–۳: qPCR(Real-Time PCR) یا PCRکمی:

امکان تشخیص دقیق و یا تعیین کمی عوامل بیماریزا را دارد که نمی توان به راحتی از بافت میزبان استخراج یا کشت کرد یا با بار تلقیح کم در نمونه ها ارائه می شود[۸۸]. PCR کمی روشی برای تعیین مقدار اولیه مولکول های DNA، RNA یا mRNAدر یک نمونه نوکلئیک اسید استخراج شده است[۳۰].دو یافته مهم منجر به کشف PCR در زمان واقعی شد: اول ، یافته ای که پلیمراز Taq دارای فعالیت ′۵–اگزونوکلئاز می باشد. دوم ، ساخت اصل انتقال انرژی (FRET). در این روشqPCR ، آنزیم پلیمراز Taq یک پروب غیر قابل توسعه با برچسب داخلی ، کاوشگر TaqManمعروف را طی مرحله گسترش PCR می شکافد[۵۳]. در حال حاضر ، PCR

کمی (qPCR) قابل اعتمادترین تکنیک برای اندازه گیری بار بیماری در یک نمونه می باشد در حالی که ویژگی گونه را فراهم می کند[۳۵ ,۴۰ ,۸۷].

این روش برای تعیین بیان یک ژن اختصاصی مورد استفاده قرار می گیرد . در این سیستم ابتدا mRNA توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس به cDNAتبدیل می شود و سپس cDNAبه یکcDNA دو رشته ای جهت تکثیر تبدیل می گردد . سپس با اضافه نمودن رنگ های شیمیایی به PCR که فقط در زمان اتصال به DNA دو رشته ای فلورسنت می دهد و سپس با اندازه گیری آن می توان پیشبرد واکنش را دنبال کرد و به طور دقیق غلظت شروع کننده را از mRNA تکثیر یافته پیدا کرد . سپس توسط نرم افزار های کامپیوتری جهت محاسبه تعداد mRNA در چندین نمونه آنالیز شود [۲].

۱- ٤:RT-PCR یا PCRدر زمان واقعی:

تکنیک مورد استفاده برای تهیه cDNA از RNA و به دنبال آن PCRنمودن cDNA تهیه شده ، RT-PCR گفته می شود[۵,۶]. این نوع از PCRبه PCRنسخه برداری معکوس نیز معروف است . ماده اولیه در آن RNA می باشد که در اولین مرحله با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس RNA به cDNA به عنوان الگو تبدیل می شود [۲]. واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR) قادر به استفاده از فن آوری های عصر ژنومی و تبدیل به روش انتخابی برای تشخیصmRNA می باشد،[۴۴]. RT-PCR یک روش استخراج برای شناسایی معکوس رونویسی از عوامل بیماریزای گیاهی از جمله ویروس ها ، باکتری ها و فیتوپلاسما نیز می باشد [۷۲]. این روش ابتدا شامل استخراج RNAاست که با رونویسی معکوس RNA به نسخه ای از cDNA توسط آنزیم ترانسکرپیتاز معکوس دنبال می شود[۳۰]. مزایای زیادی برای شناسایی گونه ها دارد، مانند حساسیت و ویژگی بالاتر، تجزیه و تحلیل سریع و شناسایی مستقیم در مقایسه با PCRمعمولی دارد[۵۴,۷۲]. این امر محقق را قادر می‌سازد تا اندازه‌ای از انعطاف‌پذیری را که در رویکردهای سنتی‌تر در دسترس نیست (به عنوان مثال، روش‌های حفاظتی لکه‌های شمالی، لکه‌های نقطه‌ای، و سنجش‌های حفاظتی هیبریداسیون و هیبریداسیون درجا) در این روش برطرف شود[۵۸]. برای مرحله RT-PCR جابجایی کامل نمونه، تکنسین های آموزش دیده، آزمایشگاه های تایید شده و تجهیزات متوسط هزینه استخراج mRNA یک پیش تحلیلی حیاتی می باشد[۳۴]. استفاده از MRNA خالص برای RT-PCR توصیه می گردد زیرا عموما رشته های cDNA بیشتری تولید می کند[۱۱]. RT-PCR پتانسیل شناسایی ژن های خاصی که طی رشد بیمارگر یا در مراحل خاصی از توسعه هستند بیان می شوند[۲۳]. RT-PCR به استفاده کننده این امکان را می دهد که بر واکنش PCR نظارت داشته وبدون اینکه مجبور باشد تا پایان واکنش منتظر بماند،مقدار RNA یا DNAحاصل را به صورت مطلق یا نسبی محاسبه کند[۲۲]. طی این روش ،آنزیم رونوشت بردار معکوس با استفاده از آغازگر اختصاصی ویروس باعث دی ان ای مکمل (cDNA) شده و سپس با استفاده از آنزیم پلی مراز تگ در واکنشPCR تکثیر می یابد.همچنین طی واکنش RT-PCR مرحله توسعه بیمارگر در مواد آلوده شناسایی می شود [۱۴].

qRT-PCR:۵-۱

qRT-PCR پرکاربردترین روش برای تعیین کمی mRNA می باشد. حساسیت و توان بالا جذاب ترین مزیت های این روش هستند[۱۰۲]. برای به دست آوردن نتایج معتبر ، qRT-PCR نیاز به نرمال سازی دقیق دارد. برای انجام این کار ، ژن های مرجع ، که حداقل تغییر در سطح بیان بین نمونه های مختلف و شرایط تجربی را نشان می دهند ، مورد نیاز است[۳۰]. اگرچه لزوماً حساستر از RT-PCRمعمولی نیست[۸۰]، اما سنجش qRT-PCR چندین مزیت قابل توجه دارد[۷۸]: (الف): آنها از گزارشگر فلورسنت استفاده می کنند .مولکول هایی برای نظارت بر تولید محصولات تکثیر در طول هر چرخهPCR ، و ترکیب مراحل تکثیر و تشخیص DNA در یک سنجش همگن، نیاز به پردازش پس از PCR را برطرف می کند. (ب) :دامنه دینامیکی گسترده آنها امکان تجزیه و تحلیل نمونه‌هایی را

که از نظر فراوانی هدف با مرتبه‌های بزرگی متفاوت هستند را می‌دهد(ج) : تنوع کمی در بین سنجش وجود دارد که به تولید نتایج قابل اعتماد و قابل تکرار کمک می کند[۳۹].

اصل سنجش qRT-PCR شامل پیروی از R.T. RNA به cDNA می باشد بنابراین، علم شیمی برای تشخیص مفید حضور محصولات PCR مورد نیاز است[۷۷,۴۵]. qRT-PCR ها با نقطه زمانی در طول چرخه زمانی که برای اولین بار تقویت یک محصول PCRشناسایی می شود مشخص می شوند. هر چه تعداد شروع نسخه برداری هدف اسید نوکلئیک بیشتر باشد، زودتر افزایش قابل توجهی در فلورسانس مشاهده می شود. تشخیص می‌تواند مبتنی بر پروب یا غیرکاوشگر باشد که به ترتیب «اختصاصی» و «غیر اختصاصی» نیز نامیده می‌شوند. پرکاربردترین آن می تواند مبتنی بر پروب، اتصال SYBR Green I به DNA ds (دو رشته ای) را تشخیص می دهد[۳۹].

: RT-qPCR:۶-۱

تجزیه و تحلیل RT-qPCR بسیار حساس است و عمدتاً برای تعیین کمیت بیان ژن استفاده شده می باشد. دقت آن می تواند تحت تأثیر کمیتRNA ، راندمان رونویسی، راندمان تقویت و روش های تجربی بین نمونه ها باشد[۱۰۹]. در میان آزمایش های تشخیصی برای کشف زودهنگام ، تشخیص RNA توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان واقعی ترانس کریپتاز معکوس (RT-qPCR) یک ابزار سریع ، خاص و حساس برای مدیریت عفونت های حاد ، نظارت و تحقیق بر روی آن است[۱۰۱]. همچنین، روش‌های توسعه‌یافته RT-qPCRباید در آزمایشگاه روی مجموعه بزرگی از نمونه‌های مرجع برای تأیید اعتبارسنجی شوند[۱۰۱,۷۶]. اگر چه یک روش بسیار دقیق و حساس می باشد ، اما اگر به درستی مورد استفاده قرار نگیرد، می تواند نتایج بسیار غیر قابل اعتمادی را به همراه داشته باشد[۹۲].

سه مرحله اصلی در RT-qPCR عبارتند از: (۱) تبدیل mRNA وابسته به ترانس کریپتاز معکوس بهcDNA ، (۲)تقویت cDNAتوسطqPCR ، و (۳) تشخیص و تعیین کمیت محصولات تقویت شده در زمان واقعی[۴۷,۶۸]. سنجش RT-qPCR را می توان به عنوان روش آنزیمی RT و PCR تک لوله ای یا روش آنزیمی RT و PCR جداگانه با استفاده از یک یا دو لوله انجام داد .انتخاب آنزیم رونویسی معکوس و استراتژی آغازگر cDNA مورد بحث و بررسی قرارمی گیرد[۴۵,۸۴,۹۴].از آنجایی که بازده رونویسی معکوس به هدف و انتخاب ترانس کریپتاز معکوس بستگی دارد، استفاده از همان آنزیم، استراتژی پرایمینگ و شرایط تجربی برای مقایسه نتایج بین آزمایشگاه‌ها مهم می باشد [۷۵].

۱-۷: PCR آشیانه ای یا Nested-PCR:

Nested PCR (تودرتو یا آشیانه ای): مشتق شده از PCR معمولی با حساسیت و ویژگی بالا می باشد .در این تکنیک از دو جفت پرایمر و آنزیم DNA پلیمراز برای تکثیر توالی هدف طی دو مرحله PCR استفاده می شود[۵۱,۴۱]. معمولاً Nested PCRبا استفاده از محصولات PCR اولیه و پرایمرهای دژنره شده برای تقویت انتخابی توالی هدف انجام می شود [۹۹]. در این روش ابتدا طیPCR ،قطعات بزرگتری تولید می شوند و سپس این قطعات به عنوان الگو برای PCR دوم به کار می روند[۲۹]. روش Nested-PCR در مقایسه با RT-PCR معمولی ، راندمان واکنشی را افزایش می دهد، انجام آن ساده ، و یک تست تشخیصی مقرون به صرفه می باشد [۹۳,۶۳].

مزیت Nested PCR در این می باشد که حساسیت و ویژگی واکنش را افزایش می دهد زیرا پرایمرهای داخلی تنها در صورتی سخت می شوند که آمپلیکون دارای توالی مورد انتظار و متناظر باشد .مرحله دوم معمولاً فاقد مواد بازدارنده می باشد که

می تواند کارایی و حساسیت مرحله اول PCR را کاهش دهد . معایب PCR تودرتو شامل زمان و هزینه اضافی مرتبط با دو مرحله PCR و افزایش خطر آلودگی ناشی از انتقال محصولات مرحله اول کاتیون به لوله دوم است[۷۰].

جدول ۱: بررسی روش های PCR استفاده شده در مقابله با عوامل بیماری زا غلات

ردیف	گیاه	نام بیماری	عامل بیماری	نوع روش	ریز نمونه درگیر	منبع
۱	ذرت	ویروس نکروز کشنده ذرت (MLN)	هم افزایی ذرت با ویروس کلروتیک ذرت	RT-PCR	برگ	[۳۷]
۲	ذرت	ویروس خط ذرت (MVSD)	ویروس خط ذرت (MSV)	PCR	برگ	[۹۷]
۳	ذرت	(MaYMV) ویروس موزاییک زرد ذرت	توسط شته هامنتقل می شود.	RT-PCR	برگ	[۱۰۴]
۴	ذرت	پژمردگی دیر رس ذرت	قارچ سفالوسپوریوم میدیس	PCR	بذر	[۳۹]
۵	ذرت	پوسیدگی ساقه ذرت(CSR)	کپک فوزاریوم (*Fusarium spp*)	PCR	بذر	[۱۰۳]
۶	ذرت	پژمردگی ذرت استوارت	باکتری استوارت	Real-Time PCR	بذر	[۸۱]
۷	ذرت	(MDMV)موزائیک کوتولگی ذرت	چندین گونه شته	qRT-PCR و PCR	برگ	[۲۲]
گیاه		**نام بیماری**	**عامل بیماری**	**نوع روش**	**ریز نمونه مورد بررسی**	**منبع**
۸	برنج	سوختگی باکتریایی برگ (BLB)	باکتری گزانتونوما (Xoo)	qRT-PCR	برگ	[۵۷]
۹	برنج	نواری برنج (RSV)	ویروسTenuivirus	RT-qPCR	بذر	[۷۶]
۱۰	برنج	باکتری برنج (BB)	باکتری گزانتونوما(Xoo)	qRT-PCR و PCR	برگ	[۵۶]
۱۱	برنج	باکانه برنج(RBD)	گونه های فوزاریوم منتقله از طریق بذر	PCR	بذر	[۶۴]
۱۲	برنج	پوسیدگی ریشه برنج	قارچ*Fusarium moniliforme*	PCR	ریشه	[۲۶]
گیاه		**نام بیماری**	**عامل بیماری**	**نوع روش**	**ریز نمونه مورد بررسی**	**منبع**
۱۳	جو	نوار برگ	لکه قهوه ای	PCR Multiplex	برگ	[۵۲]

۱۴	جو	جوشگاه	قارچ *(Rhynchosporium)*	RT-PCR	بذر و برگ	[۷۱]
۱۵	جو	لکه برگی(RLS)	قارچ*(Ramularia collo-cygni)*	RT-qPCR	برگ	[۸۹]
۱۶	جو	قارچی زنگ زدگی	قارچ*(Puccinia hordei)*	qRT-PCR و PCR	برگ	[۴۹]
۱۷	جو	لکه قهوه ای نواری	انگل*(Pyrenophora graminea)*	PCR	برگ	[۱۲]
گیاه		**نام بیماری**	**عامل بیماری**	**نوع روش**	**ریز نمونه درگیر**	**منبع**
۱۸	گندم	انفجار گندم	قارچ*(Magnaporthe oryzae Triticum (MoT))*	real-time PCR و PCR	برگ و بذر	[۶۶]
۱۹	گندم	زنگ زرد	*(Puccinia striiformis f. sp tritici)*	PCR	برگ	[۱۰۶]
۲۰	گندم	کوتوله گندم	سیاهک پا کوتاه گندم *(Tilletia controversa)*	qRT-PCR	برگ	[۵۰]
۲۱	گندم	بنت معمولی	سیاهک پنهان گندم *(Tilletia laevis)*	real-time PCR یا qpcr	برگ و آویزهای گندم	[۱۰۷]
۲۲	گندم	زنگ گندم	قارچ *(Puccinia)*	PCR	برگ	[۱۸]
۲۳	گندم	موزاییک باکتریایی گندم	باکتری *(Clavibacter tessellarius)*	PCR	برگ	[۲۸]
۲۴	گندم	سپتوریوز برگ گندم	قارچ*(Zymoseptoria tritici)*	qRT-PCR	برگ	[۴۳]
۲۵	گندم	موزائیک رگه ای گندم(wsmv)	کنه گندمی *(Aceria Fisichella Keifer)*	Nested PCR و (RT-PCR)	برگ	[۱۰۵,۱۰۰]
گیاه		**نام بیماری**	**عامل بیماری**	**نوع روش**	**ریز نمونه درگیر**	**منبع**
۲۶	سورگوم	لکه مغز پوشیده شده (CKS)	قارچ سیاهک پنهان سورگوم *(Sporisorium sorghi)*	PCR	بذر	[۷۴]
۲۷	سورگوم	بلایت برگی (NLB)	قارچ*(Exserohilum turcicum)*	qPCR	برگ	[۶۱]

۲۸	سورگوم	موزاییک سورگوم	ویروس موزاییک سورگوم(SrMV)	qRT-PCR	برگ	[۶۹]

شکل ۱: علائم بیماری پوسیدگی ریشه برنج[۱۹]

شکل ۲ : درجه های مختلف علائم برگی بیماری لکه قهوه ای نواری جو[۳].

شکل۳ :علائم موزائیک کوتولگی در برگ گیاه ذرت [۲۵].

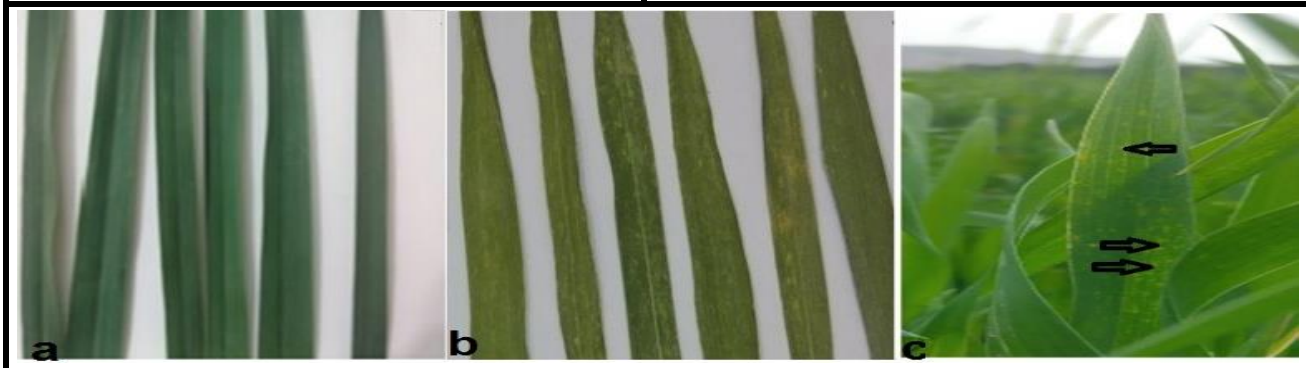
شکل٤ : علائم بیماری سپتوریوز برگ گندم[١٦].

شکل ٥ :بیماری برگ گیاه گندم، آلوده به زنگ گندم [٢٤].

شکل ٦ : علائم بیماری بلایت برگ سورگوم[٦١].

شکل۷:علایم بیماری بلایت برگی سورگوم با عامل قارچ *Exserohilum turcicum*
d- a) توسعه بیماری در برگ سورگوم e) اسپورزایی قارچ عامل بیماری f) کنیدیوم های عامل بیماری [۲۷].

شکل ۸ : علایم بیماری سوختگی باکتریایی برنج
a): برگ سمت راست دارای علایم سوختگی
b): برگ های جوان گیاه دارای علایم سوختگی[۱۳].



شکل ۹- علایم بیماری موزاییک باکتریایی گندم در مزرعه. c و b: نقاط و لکه های زرد و رنگ پریده در برگ ها که به هم پیوسته و رگه مانند مشاهده می شوند. a: نمونه های بدون علایم از برگ گندم[۲۸].

نتیجه گیری:

ویروس ها ، باکتری ها و قارچ های بیماریزای گیاهی باعث افزایش خسارات اقتصادی در سراسر جهان هستند. آنها می توانند طیف وسیعی از علائم را در بیشتر گیاهان زراعی ایجاد کنند که در اثرات مختلف زراعی در قسمتهای مختلف آنها تأثیر می گذارد. مجموعه تکنیک های تشخیص سریع عوامل بیماریزا گیاهان از قبیل PCR در چند سال گذشته بهبود و افزایش یافته است که توسط متخصصان بیماریهای گیاهی به عنوان روش های مقرون به صرفه پذیرفته می شوند.

در این تحقیق ما به ارائه سنجش های مبتنی بر PCR با استفاده از منابع مختلف و پراکنده داخلی و خارجی پرداختیم تا در این مقاله به صورت مفید و کلی برای افرادی که قصد انجام کار علمی تحقیقاتی و آشنایی در این زمینه را دارند فراهم کنیم. با تجزیه تحلیل جدول ۱، اطلاعات بسیاری در زمینه بیماریهای گیاهی می توان دریافت که قارچ ها عامل بسیاری از بیماریهای غلات هستند . برخی از این بیماریها که در این تحقیق به آنها اشاره شد در کشورمان ایران رخ می دهد که می توانیم روشهایی که محققین از آنها استفاده نموده اند را نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار دهیم ، برخی از بیماریهای دیگر در مناطق خاصی از جهان رخ می دهند، اما امکان دارد از راههای مختلف به مناطق جغرافیایی دیگر سرایت کنند و راه کنترل و مدیریت با آنها از طریق روشهای PCR در این تحقیق معرفی شده اند، که می توان مقالات و کتب چاپ شده آنها را برای گونه های مشابه و هم خانواده که مورد بیماری قرار گرفته اند را مورد مطالعه قرار داد.

مراجع:

۱. آیت اللهی ، جمشید و همکاران ؛ کاربرد PCR برای تشخیص بیماری های عفونی، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ، دوره ۱۸ ، شماره ۶ ، بهمن و اسفند ۱۳۸۹ ، صفحه ۵۸۰.

۲.ابوالقاسم ،اسماعیلی و همکاران ؛ تکنیک های مولکولی بیان ژن در سطح MRNA. انتشارات دانشگاه اصفهان ،۱۳۹۷، صفحات ۸۱-۷۵.

۳. اقنوم ،رضا ؛ مدیریت بیماری لکه قهوه ای نواری، انتشارات نشر آموزش کشاورزی ، ۱۳۹۸،صفحه ۹.

۴.احمدی ، پری السادات و همکاران (ترجمه)؛ ژن کلونینگ اصول و مفاهیم ، انتشارات بشری،۱۳۹۱، صفحه ۷۰- ۶۸

۵.استفنسن،فرانک ؛محاسبات در زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی، ترجمه : سمیده خوئی و سایرین، انتشارات خانه زیست شناسی ۱۳۸۵، صفحه ۲۱۲.

۶.استفنسن،فرانک؛ محاسبات ریاضی در زیست شناسی مولکولی و زیست فناوری، ترجمه :محمد رضا محمد آبادی وامین باقی زاده انتشارات آییژ، ۱۳۹۲،صفحه ۲۱۳.

۷. آر.گلیک ، برنارد و پاسترنک ، جک جی ؛ بیوتکنولوژی مولکولی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۹۰، صفحه ۱۶۶.

۸. براون ، تی .ای؛ کلون سازی ژن و بررسیDNA .ترجمه: ندا سرای گرد افشاری و سایرین. انتشارات برای فردا، ۱۳۹۶،صفحات ۱۶۱-۱۷۱.

۹. بروان ، ترنس اوستن ؛ مقدمه ای بر کلون سازی ژن و آنالیز DNA، ترجمه : اسعد آذرنژاد و سایرین ، انتشارات کارآفرینان جوان، ۱۳۹۳صفحه۱۶ .

۱۰. بهرامی منجمی،غلامرضا، ژنتیک، انتشارات انواردانش عصر ،۱۳۹۳،صفحه ۲۷۵.

۱۱.جی . مایکل و همکاران ؛واکنش زنجیره ای PCR،ترجمه :غلامرضا زرینی و سایرین،انتشارات آییژ. چاپ دوم، ۱۳۹۶ ،صفحه ۲۲۹.

۱۲. خلیلی ، محبوبه و همکاران ؛ ردیابی ژن های mlo و Rdg1a در جو برای مقاومت به بیماری های لکه قهوه ای نواری سفیدک.پودری، نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی). تابستان ۱۳۹۹. صفحه ۱۹۴-۱۸۳.

۱۳.خوشکدامن ، مریم ؛ بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج ،انتشارات موسسه تحقیقات برنج کشور ، چاپ اول ۱۳۹۲،صفحه ۵.

۱۴. دیکینسون، متیو؛ بیماری شناسی گیاهی از دیدگاه مولکولی، ترجمه : دوستمراد ظفری ، فرناز جلالی، انتشارات دانشگاه بو علی سینا ۱۳۹۳،صفحه ۳۴۷.
۱۵. ریاحی مدوار،علی و همکاران (ترجمه) ؛مقدمه ای بر کلون سازی ژن ها و آنالیز DNA، انتشارات اشراقیه ،۱۳۹۳، صفحه ۸ .
۱۶. رضوی ،محمد ؛ مدیریت بیماری سپتوریوز برگ گندم ،انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور ،۱۳۹۴،صفحه ۵ –۴.
۱۷. رضوان ،حسین(ترجمه) ؛ درآمدی بر DNA وکلون ژن ،انتشارات دانشگاه بوعلی سینا ،۱۳۹۳،صفحه ۵ .
۱۸. شهرکی ،ملیحه و همکاران؛ شناسایی تنوع ارقام گندم سیستان از لحاظ ژن های مقاومت به عوامل بیماری های زنگ گندم با نشانگر ریز ماهواره، مجله علمی ـ پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی،سال هشتم ،شماره بیست و سوم ، پائیز ۱۳۹۷، صفحات ۸۰–۵۹.
۱۹. صارمی ، حسین ؛ بررسی بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج در استانهای گیلان و زنجان و معرفی ارقام نسبتاً مقاوم به بیماری ،مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی ،۱۳۸۴، صفحات ۵۲–۴۱
۲۰. صفائی ، ناصر و همکاران؛ نشانگرهای مولکولی در بیوتکنولوژی کشاورزی انتشارات حق شناس،۱۳۸۹، صفحه ۴۴.
۲۱. صادقیان بهنوئی ، مهدیه و همکاران ، فاکتورهای تاثیرگذار بر کارایی روش آگروباکتریوم جکشن برای بیان سیستمیک ژن خارجی در گیاه ذرت به واسطه ویروس موزائیک نیشکر،مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ، ایران ،دوره ۱۳ ، شماره ۴ ،زمستان ۱۴۰۰،صفحات ۱۵۹–۱۸۲.
۲۲. فریلند ، جوانا ؛ بوم شناسی مولکولی، ترجمه :منصوره ملکیان ،انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد ،۱۳۹۱،صفحه ۳۴.
۲۳. کینسون،ام.دی؛ بیماری شناسی گیاهی مولکولی، ترجمه : داود کولیوند و سایرین ، انتشارات عمیدی ، ۱۳۹۳، صفحه ۳۶۷.
۲۴. مباشری، محمد رضا و همکاران؛ تخمین شدت بیماری زنگ برگ گندم با استفاده از روش های کد گذاری طیف بازدارندگی، نشریه علمی پژوهشی مهندسی فناوری اطلاعات مکانی، ۱۳۹۷، صفحه ۳۰–۱۷.
۲۵ .مصطفوی نیشابوری،فروه السادات و همکاران؛ بررسی مولکولی برخی تغییرات فیزیولوژیک در ژنوتیپ های حساس و متحمل ذرت در پاسخ به آلودگی ویروس موزاییک کوتولگی ذرت، مجله پژوهشهای کاربردی در گیاه پز شکی، جلد ۷ شماره ۳، ۱۳۹۷ ،صفحه۱۷–۱
۲۶. نوراللهی ، خشنود و حقی ، زینب ؛ ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Fusarium verticillioides* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه برنج در استان ایلام با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای ،مجله آفات و بیماریهاری گیاهی (مقاله انگلیسی).۱۳۹۴. صفحات ، ۲۲–۱۳.
۲۷.مومنی ، حسن و همکاران ؛دستنامه گیاه پزشکی سورگوم ،انتشارات موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور،چاپ اول۱۳۹۷ ، صفحه ۴۲
۲۸. نصیری ،مصطفی و همکاران؛ وقوع و پراکنش بیماری موزاییک باکتریایی گندم در جنوب ایران،مجله گیاه پزشکی ، پائیز۱۴۰۰،جلد ۴۴ شماره ۳ ،صفحات ۷۴–۵۹.
۲۹. نیوتن ، کلایو و گراهام، الکس ؛واکنش زنجیره ای پلی مراز PCR،ترجمه ،فرج ا... شهریاری و عباسعلی امام جمعه ، انتشارات دانشگاه امام رضا، ۱۳۸۱،صفحه ۷۱.
۳۰. ورکویل ،الیزابت ون پلت و همکاران؛ اصول و روش هایPCR ، ترجمه :بهرام باقر دوست و لیلا خدادوستان، انتشارات فاطمی ،۱۳۹۱، صفحات ۱۶۶–۷۲
۳۱. هنری،آر.جی؛ کاربردهای عملی بیولوژی مولکولی گیاهی، ترجمه:عبدالرضا باقری و سایرین، انتشارات دانشگاه فردوسی،۱۳۹۱،صفحه ۱۶۹.
۳۲. یوسف آملی ، شمس الدین و همکاران(ترجمه) ؛ژنتیک مولکولی پزشکی هافی، انتشارات نهر ،۱۳۹۲،صفحه ۱۷۸.

33.Allahdou, M., *et al*.The identification of Eb chromosomes in tritipyrum primary lines using random and semi random primers. *Trakia J Sci*, 2009, 4: 1-6.
34.Aquino, Adriano, *et al*. "Updating the use of nano-biosensors as promising devices for the diagnosis of coronavirus family members: A systematic review." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2022, 114608.
35.Abdullah, Araz S., *et al*. "Real-time PCR for diagnosing and quantifying co-infection by two globally distributed fungal pathogens of wheat." *Frontiers in plant science* 2018, 1086
36.Artyukhov, A. S., *et al*. "New genes for accurate normalization of qRT-PCR results in study of iPS and iPS-derived cells." *Gene* 626 2017, 234-240
37.Asadi, R., & Mollasalehi, H. The mechanism and improvements to the isothermal amplification of nucleic acids, at a glance. *Analytical Biochemistry*, 2021, 631: 114260.
38.Asiimwe, Theodore, *et al*. Maize lethal necrosis viruses and other maize viruses in Rwanda. *Plant Pathology*, 2020, 69.3: 585-597.
39. Awad, A. M., *et al.* PCR and nanotechnology unraveling detection problems of the seed-borne pathogen Cephalosporium Maydis, the causal agent of late wilt disease in maize. *Int. J. Nanotechnol. Allied Sci*, 2019, 3.2: 2019-2021.
40.Bates, J. A., *et al*. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of Pyrenophora species in barley seed. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2.1: 49-57
41. Behzadi, P., Ranjbar, R., & Alavian, S. M.Nucleic acid-based approaches for detection of viral hepatitis. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015, 8.1.
42. Bermingham, N., & Luettich, K.Polymerase chain reaction and its applications. *Current diagnostic pathology*, 2003, 9.3: 159-164.
43.Brennan, Ciarán J., *et al*. Taxonomically restricted wheat genes interact with small secreted fungal proteins and enhance resistance to Septoria tritici blotch disease. *Frontiers in plant science*, 2020, 11: 433.
44.Bustin, S. A., *et al*. Quantitative real-time RT-PCR–a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 2005, 34.3: 597-601.
45.Bustin, S. A., & Mueller, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 2005, 109.4: 365-379.
46.Bustin, S. A., & Nolan, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 2004, 15.3: 155
47.Chang, Ming-Mei, *et al*. RT-q PCR demonstrates light-dependent A t RBCS1A and A t RBCS3B m RNA expressions in Arabidopsis thaliana leaves. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2016, 44.4: 405-411.
48.Chapwanya, M., Matusse, A., & Dumont, Y.On synergistic co-infection in crop diseases. The case of the Maize Lethal Necrosis Disease. *Applied Mathematical Modelling*, 2021, 90: 912-942.
49.Chen, Chunhong, *et al.* BED domain-containing NLR from wild barley confers resistance to leaf rust. *Plant biotechnology journal*, 2021, 19.6: 1206-1215.
50.Chen, Delai, *et al.* Wheat Varietal Response to Tilletia controversa JG Kühn Using qRT-PCR and Laser Confocal Microscopy. *Genes*, 2021, 12.3: 425.
51.Cobo, Fernando.. Suppl 1: applicatio n of molecular diagnostic techniques for viral testing. *The open virology journal*, 2012, 6: 104.
52.Dokhanchi, H., Babai-Ahari, A., & Arzanlou, M. Distribution of mating type alleles in Iranian populations of Pyrenophora graminea, the causal agent of barley leaf stripe disease, using a multiplex PCR approach. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156.2: 343-354
53.Draganov, P., *et al*. Real-time PCR and its applications in human papillomavirus quantitation and physical status identification. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2004, 18.2: 153-160
54.DWIYITNO, DWIYITNO, et al. Universal primer design for crustacean and bivalve-mollusc authenticity based on cytochrome-b gene: Universal primer for crustacean and bivalve-mollusc. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 2022, 23.1.
55.Elnifro, Elfath M., *et al*.Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 2000, 13.4: 559-570.

56.Feronato, Cesar, *et al*. Development and evaluation of a nested-PCR assay for Senecavirus A diagnosis. *Tropical animal health and production*, 2018, 50.2: 337-344.

57.Fordjour, Eric, *et al.* Screening rice (Oryza sativa) cultivars for resistance to bacterial leaf blight disease. *Int. J. Agric Biol*, 2020, 24: 1233-1241.

58.Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E .Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 1999, 26.1: 112-125

59.Frère, Céline H., *et al.* Lack of low frequency variants masks patterns of non-neutral evolution following domestication. *PLoS One*, 2011, 6.8: e23041

60.Gyawali, Sanjaya, *et al*. Seedling and adult-plant stage resistance of a world collection of barley genotypes to stripe rust. *Journal of Phytopathology*, 2018, 166.1: 18-27.

61.Ganjali, S., Siahsar, B. A., & Allahdou, M.Investigation of genetic variation of lentil lines using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intron-exon splice junctions (ISJ) analysis. *Int Res J Appl Basic Sci*, 2012, 3: 466-478.

62.Hennet, Lauriane, *et al*.Transcriptional regulation of sorghum stem composition: key players identified through co-expression gene network and comparative genomics analyses. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 224.

63.Jiang, Chunmiao, *et al.* Identification and expression pattern analysis of bacterial blight resistance genes in Oryza officinalis wall ex watt under Xanthomonas oryzae Pv. oryzae stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2019, 37.5: 436-449.

64.Jiang, Hubiao, *et al.* Identification of rice seed-derived fusarium Spp. and Development of LAMP Assay against Fusarium Fujikuroi. *Pathogens*, 2020, 10.1: 1.

65.Kalendar, R., Lee, D., & Schulman, A. H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 2011, 98.2: 137-144.

66.Kang, Houxiang, *et al*. Rapid detection of wheat blast pathogen Magnaporthe Oryzae Triticum pathotype using genome-specific primers and cas12a-mediated technology. *Engineering*, 2021, 7.9: 1326-1335.

67.Gangwar, O. P., *et al*.Barley disease and their management: An Indian perspective. *Wheat and Barley Research*, 2018, 10.3: 138-150.

68.Langenhoven, B., Murray, S. L., & Crampton, B. G.Quantitative detection of Exserohilum turcicum in northern leaf blight diseased sorghum and maize leaves. *Australasian Plant Pathology*, 2020, 49.6: 609-617.

69.Ling, Hui, *et al*. Transcriptional insights into the sugarcane-sorghum mosaic virus interaction. *Tropical plant biology*, 2018, 11.3: 163-176.

70.Tang, Y. W., Stratton, C. W., & Tang, Y. W.*Advanced techniques in diagnostic microbiology*. New York: Springer, 2013.

71.Looseley, Mark E., *et a*l. Characterisation of barley landraces from Syria and Jordan for resistance to rhynchosporium and identification of diagnostic markers for Rrs1Rh4. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133.4: 1243-1264.

72.López, María M., *et al*. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. *Current issues in molecular biology*, 2009, 11.1: 13-46.

73.Mirmajlessi, Seyed Mahyar, et al. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis-a review. *Plant Protection Science*, 2015, 51.4: 177-190.

74.Moharam, M. H., & Hassan, M. A. Defense response of seedling plumule and mesocotyl of sorghum to infection by Sporisorium sorghi, causing covered kernel smut in relation to disease resistance classes. *Australasian Plant Pathology*, 2020, 49.1: 1-14.

75.Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 2006, 1.3: 1559-1582.

76.Okuda, Mitsuru, *et al*. Analysis of symptom development in relation to quantity of Rice stripe virus in rice (Oryza sativa) to simplify evaluation of resistance. *Phytopathology*, 2019, 109.4: 701-707.

77.Oladipo, Elijah Kolawole, *et a*l. Laboratory diagnosis of COVID-19 in Africa: availability, challenges and implications. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2020, 14.4: 153-160.

78.Orlando, C., Pinzani, P., & Pazzagli, M.. Developments in quantitative PCR. 1998.

79.Osman, F., & Rowhani, A. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of virological methods*, 2006, 133.2: 130-136.

80.Ozoemena, L. C., Minor, P. D., & Afzal, M. A. Comparative evaluation of measles virus specific TaqMan PCR and conventional PCR using synthetic and natural RNA templates. *Journal of medical virology*, 2004, 73.1: 79-84.

81.Pal, N., Block, C. C., & Gardner, C. A .A real-time PCR differentiating Pantoea stewartii subsp. stewartii from P. stewartii subsp. indologenes in Corn Seed. *Plant disease*, 2019, 103.7: 1474-1486.

82.Paterson, Andrew H.Genomics of sorghum. *International Journal of Plant Genomics*, 2008

83.Peeling, Rosanna W., *et al*. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8.12: S30-S37.

84.Pullmann, M., Hergarten, S., & Laube, N. Influence of a variable differential function on the stone-growth-related urinary depletion effect. *Clinical chemistry*, 2004, 50.9: 1675-1678.

85.Saiki, Randall K., *et al*. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230.4732: 1350-1354.

86.Sankaran, Sindhuja, *et al*. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and electronics in agriculture*, 2010, 72.1: 1-13.

87.Hayden, Katherine J., *et al*.Detection and quantification of Phytophthora ramorum from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 2004, 94.10: 1075-1083.

88.Mirmajlessi, Seyed Mahyar, *et al*. PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review. *Systematic reviews*, 2015, 4.1: 1-11.

89.Sghyer, H., & Hess, M. Culture conditions influence conidial production by the barley pathogen Ramularia collo-cygni. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2019, 126.4: 319-327.

90.Shah, Devendra H., *et al*. Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing Salmonella gallinarum from Salmonella pullorum: serotype-specific rfbS sequence polymorphism. *Journal of microbiological methods*, 2005, 60.2: 169-177.

91.Shiferaw, Bekele, *et al.* Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food security*, 2011, 3.3: 307-327.

92.Škiljaica, A., *et al*.. Evaluation of reference genes for RT-qPCR gene expression analysis in Arabidopsis thaliana exposed to elevated temperatures. *Plant Biology*, 2022.

93.Snounou, G., & Singh, B. Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. In: *Malaria methods and protocols*. Humana Press, 2002. p. 189-203.

94.Stahlberg, Anders, et al. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical chemistry*, 2004, 50.3: 509-515.

95.Sue, Mei Jean, et al. Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *BioMed research international*, 2014.

96.Sundelin, T., Collinge, D. B., & Lübeck, M. A cultivation independent, PCR-based protocol for the direct identification of plant pathogens in infected plant material. *European journal of plant pathology*, 2009, 123.4: 473-476.

97.Tembo, Mathias, *et al.* A quick and sensitive diagnostic tool for detection of Maize streak virus. *Scientific reports*, 2020, 10.1: 1-10.

.98.Schena, L., K.J. Hughes, and D.E. Cooke, *Detection and quantification of Phytophthora ramorum, P. kernoviae, P. citricola and P. quercina in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR.* Mol Plant Pathol, 2006. **7**(5): p. 365-79.

99.Tonooka, Y., & Fujishima, M. Comparison and critical evaluation of PCR-mediated methods to walk along the sequence of genomic DNA. *Applied microbiology and biotechnology*, 2009, 85.1: 37-43.

100.Trzmiel, K., Szydło, W., & Hasiów-Jaroszewska, B. Biological and molecular characterisation of the two Polish Wheat streak mosaic virus isolates and their transmission by wheat curl mites. *Plant Protection Science*, 2021, 57.3: 171-178.

101.Vanneste, Kevin, *et al*. Application of whole genome data for in silico evaluation of primers and probes routinely employed for the detection of viral species by RT-qPCR using dengue virus as a case study. *BMC bioinformatics*, 2018, 19.1: 1-18.

102.Walker, N. J. A technique whose time has come. *Science*, 2002, 296.5567: 557-559.

103.Wang, Shuang, et al. Bacillus velezensis BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by Fusarium graminearum. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2020, 30.1: 1-10.

104.Welgemoed, Tanya, *et al*. Next generation sequencing reveals past and current widespread occurrence of maize yellow mosaic virus in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 158.1: 237-249.

105.Wen, R. H., & Hajimorad, M. R .Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology*, 2010, 400.1: 1-7.

106. Woubit, Dawit, *et al*.Haplotype analysis of Ethiopian bread wheat (Triticum aestivum) cultivars and elite lines for yellow rust resistance genes using linked molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 2019, 18.2: 37-57.

107.Xu, Tongshuo, *et al*. Development of droplet digital PCR for the detection of Tilletia laevis, which causes common bunt of wheat, based on the SCAR marker derived from ISSR and real-time PCR. *Scientific reports*, 2020, 10.1: 1-10.

108.Yang, Jing, *et al*. Identification of a phytoplasma associated with Syringa reticulata witches' broom disease in China. *Forest Pathology*, 2020, 50.3: e12592

109.Yang, Xiaowei, *et al*. Reference gene selection for RT-qPCR analysis in Harmonia axyridis, a global invasive lady beetle. *Scientific Reports*, 2018, 8.1: 1-10.