Crop Biotech.
Winter (2015) 12: 55-66.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دوازدهم، زمستان ۱۳۹۴ (۶۶-۵۵)

استخراج مستقیم و خالص‌سازی DNA کل از جامعه میکروبی خاک و ردیابی مولکولی فرم‌های اختصاصی بیمارگر خاکزاد *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی

محمدعلی ابراهیمی[1*]، شیوا اله‌یار پارسا[2]، سعیده پیرایش[3]
۱. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران
۲. کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران
۳. دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۲۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۲۱)

Direct extraction and purification of soil microbial total DNA and molecular detection of soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum* causal agent of tomato vascular wilt

Mohammad Ali Ebrahimi[1*], Shiva Alahyar Parsa[2], Saeedeh Piraish[3]
1. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. M.Sc. of Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Ph.D. of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
(Received: Dec. 13, 2015 - Accepted: Mar. 11, 2016)

چکیده

دستیابی به اطلاعات مولکولی و ژنتیکی توانسته است بسیاری از چالش‌های علوم زیستی را در جنبه‌های مختلف حل کند. روش‌های کاربردی بسیاری جهت استخراج DNA از بافت‌های جانوری و گیاهی و سایر موجودات زنده شناسایی و معرفی شده است.، در بسیاری مطالعات ژنتیکی در جوامع میکروبی، اغلب نیاز به استخراج مستقیم DNA از خاک است. در این تحقیق پس از مطالعه دقیق روش‌های مختلف پیشنهادی، سه روش (شیمیایی- آنزیمی)، (شیمیایی- مکانیکی) و (شیمیایی- آنزیمی- مکانیکی)، جهت استخراج DNA ازجامعه میکروبی خاک، جداگانه طرح و مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت تا مناسب‌ترین روش، شناسایی و معرفی شود. مقایسه بین روش‌های مختلف در شرایط برابر و ۵ تکرار برای هر روش، در محصول DNA اختلاف مشخصی را از میانگین غلظت۲/۳۲ تا ٦/۱ نانوگرم بر میکرولیتر DNA رقیق شده، نشان داد و همچنین بر اساس اطلاعات بدست آمده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز و بررسی نسبت DNA به پروتئین در محصول استخراج DNA، روش (شیمیایی- آنزیمی-مکانیکی) با کارایی بهتر در غلظت بیشتر، حذف هیومیک‌اسید، پروتئین و سایر آلودگی‌ها به سایر روش‌ها برتری داشت. در این تحقیق همچنین ردیابی مولکولی بیمارگرها به عنوان یکی از کاربردهای مهم استخراج مطرح و فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis *lycopersici* عامل پژمردگی آوندی در گوجه‌فرنگی از جامعه میکروبی خاک به وسیله تکنیک‌های مولکولی با آغازگر اختصاصی uni شناسایی شد. نتایج ردیابی مولکولی، حضور فرم‌های اختصاصی این بیمارگر را در نمونه خاک S1 با ۵ تکرار تائید می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: استخراج DNA، ردیابی مولکولی، *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*، *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

Abstract

Molecular analysis is often required in many genome extracted from various tissues. In much molecular analysis of genetic studies of microbial communities, often require direct extraction of DNA from soil. In this study, after careful study of the various methods proposed three methods (chemical enzyme), (chemi-mechanical) and (chemical mechanical enzymatic), in order to extract DNA from soil, a separate project was studied to most identify different methods of extraction. The comparison between the same conditions, a significant difference in the DNA product of the average concentration of 2/32 to 6/1 ng per µl DNA was diluted and also on the basis of information obtained from Nanodrop and electrophoresis device and review of the DNA extracted protein product DNA, methods (chemical, mechanical, enzymatic) better performance at higher concentrations, remove humic acid proteins and other contaminants was superior to other methods. The molecular detection of pathogens that extraction is important applications; the aim of this study is molecular detection of pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* of soil microbial community by molecular techniques to identify the special primer evaluated. Molecular detection results showed that there is tomato Fusarium infection in soil samples S1.

Keywords: DNA extraction, molecular track, *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*.

* نویسنده مسئول: محمدعلی ابراهیمی
E-mail: ma_ebrahimi@pnu.ac.ir

مقدمه

امروزه با پیشرفت و توسعه روز افزون علم بیوتکنولوژی در جنبه‌های مختلف شاهد معرفی روش‌ها و تکنیک‌های مورد نیاز و جدید برای دستیابی به اطلاعات مفید برای حل مشکلات گوناگون بشر هستیم. دستیابی به اطلاعات مولکولی و ژنتیکی جدید در خصوص موجودات زنده توانسته و خواهد توانست، اطلاعات بسیار ارزشمندی را در خصوص موجودات زنده برای بشر به همراه آورد تا بتواند چالش‌های اساسی پیش‌رو خود را شناسایی و برطرف کند. اما نیل به این موفقیت نیاز مبرم به شناسایی و معرفی روش‌های کارآمد برای دستیابی به اطلاعات مولکولی و ژنتیکی دارد. در بسیاری از آنالیزهای مولکولی اغلب نیاز است، ژنوم موجودات از بافت‌های مختلف استخراج گردد. تا کنون روش‌های کاربردی بسیاری جهت استخراج DNA از بافت‌های جانوری و گیاهی و سایر موجودات زنده معرفی و به خدمت گرفته شده است. اما بسیاری از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد یا سایر موجودات زنده خاک، به راحتی قابل جداسازی و بررسی ژنتیکی با امکانات موجود نیستند. بی‌تردید این امر در مطالعاتی چون ردیابی قطعات ژنوم در خاک به منظور شناسایی عوامل میکروبی خاک، بررسی فیلوژنی موجودات زنده خاک، مباحث مربوط به DNAهای محیطی[1]، شناسایی موجودات بر اساس بارکدهای ژنتیکی، طراحی آغازگرهای اختصاصی، ردیابی بیمارگرها و حذف آنها قبل از کاشت محصولات زراعی به خوبی مشهود است. لذا در بررسی جوامع میکروبی اغلب نیازمند استخراج مستقیم DNA هستیم. در جدیدترین مقالات منتشر شده روش‌های مختلف استخراج ژنوم از جوامع و بافت‌های گوناگون در حال بررسی و مقایسه است و هنوز چالش شناسایی یک روش کارآمد و مناسب در اغلب مطالعات ژنتیکی به چشم می‌خورد (Hart *et al*. 2015). لذا لازم است در بین روش‌های استخراج DNA از جامعه میکروبی خاک که از منابع علمی متعدد قابل دریافت است، بهترین و کارآمدترین روش از لحاظ خلوص و غلظت محصول DNA شناسایی، توصیه و به‌کار گرفته شود.

جمعیت‌های میکروبی نقش حیاتی را در حفظ حاصلخیزی خاک با تنظیم چرخه، حفظ و رهاسازی مواد غذایی اساسی در خاک ایفا می‌کنند (Torsvik *et al*., 2002). با بررسی نتایج سایر محققان مربوط می‌توان مدعی شد، که بیش از ۹۹ درصد میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، برای پژوهش‌های پایه‌ای بیوتکنولوژی قابل دسترس نبوده و همچنین قابلیت کشت مناسب را نیز ندارند (Knietsch *et al*., 2003). تا کنون چندین روش برای استخراج مستقیم و خالص‌سازی کل DNA جمعیت از نمونه‌های مختلف محیطی معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Liesack and Wayland, 1991; Burgman *et al*., 2003; Torsvik *et al*., 2002; Robe *et al*., 2001; Luna *et al*., 2006). اما روش‌های مرسومی که در حال حاضر معرفی شده‌اند، نتایجی را ارائه می‌کنند که به سختی پروفایل جامعی از تنوع میکروبی بافت خاک را نشان می‌دهد (Luo *et al*., 2003). از طرف دیگر، استفاده از PCR ژن‌های 16srRNA و سایر ژن‌های مهم اکولوژیکی اگرچه نسبت به روش‌های سنتی‌تر داده‌های مناسبی را ارائه کرده‌اند، اما این داده‌ها نتوانسته دامنه اطلاعات جوامع میکروبی خاک را افزایش چشمگیری دهد. کارآمدی روش‌های استخراج DNA ضامن آنالیزهای مولکولی جوامع میکروبی در نمونه‌های ترکیبی محیطی مانند نمونه خاک می‌باشد. در صورتی که تعیین دقیق جمعیت میکروبی قابل دستیابی باشد، کارایی استخراج هر اسیدنوکلئیک، بیانگر موفقیت آن روش استخراج است (Robe *et al*., 2003; Lipthay *et al*., 2004). خالص‌سازی DNA از خاک، به خصوص در خاک‌هایی

1. Environmental DNA

با ترکیبات هیومیک‌اسید بالا همانند خاک شالیزارها، اغلب نتایج مناسبی در بر ندارد (Courtois *et al*., 2001). چرا که مواد هیومیک به دلیل شباهت فیزیکوشیمیایی با نوکلئیک‌اسیدها معمولاً در طول استخراج DNA از خاک‌ها همراه با آن‌ها استخراج شده و می‌توانند در ردیابی، اندازه‌گیری و خالص‌سازی DNA اختلال ایجاد کنند (Yeates *et al*., 1998). بر اساس نظرات Luo و همکاران (۲۰۰۳) آلودگی ناشی از مواد هیومیک می‌تواند بازدارنده فعالیت Taq پلیمراز در طی فرایند PCR باشد. روش‌های متعددی برای استخراج DNA جامعه از نمونه‌های خاک ارائه شده است، اما هیچ یک از این روش‌ها به مقدار کافی قوی نیست که توسط جامعه علمی به عنوان یک روش استاندارد مورد قبول واقع شود.

قارچ فوزاریوم که توسط Link در سال ۱۸۰۹ توصیف شد در سه قرن اخیر یکی از جنس‌هایی بوده که تعداد زیادی از بیمارگرهای گیاهی را در برگرفته است. این جنس با داشتن تعداد زیاد گونه و تنوع بالا در گونه‌ها، همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه همیشه به عنوان یک جنس مهم در کشاورزی مطرح بوده است. در سال ۲۰۰۹، در فهرستی که توسط انجمن بیماری‌شناسی آمریکا (APS)، ارائه شده، گزارش گردید که از ۹۸ گیاه مهم اقتصادی، هر گیاه حداقل به یک گونه از قارچ فوزاریوم حساس است. این قارچ با ایجاد علائمی مثل زرد شدن برگ‌های جوان و گسترش آن و سپس نکروزه شدن، نمود می‌یابد. همچنین بافت‌های آوندی و ساقه گیاه آلوده شده و سرانجام پوسیدگی ریشه، طوقه، ساقه و نکروزه شدن بافت آوندی موجب پژمردگی و مرگ کامل گیاه می‌شود. شناسایی گونه‌های فوزاریوم پس از خالص‌سازی قارچ به روش‌های مختلف مثل استفاده از محیط کشت اختصاصی با استفاده از کلیدهای شناسایی مورفولوژیک معتبر، امکانپذیر است، اما زیرگونه‌های تاکسونومیکی این قارچ دارای اختصاصیت میزبانی بوده و تفکیک آنها در حد فرم اختصاصی یا نژاد از یکدیگر، جز با انجام آزمون بیماری‌زایی روی گونه‌ها و ارقام میزبان و یا انجام بررسی‌های مولکولی امکان‌پذیر نیست. انجام آزمون‌های بیماری‌زایی علاوه بر اینکه زمان زیادی نیاز دارد، باید در شرایط کاملاً مشابه و روی گونه‌ها و ارقام خاص موردنظر در مزارع یا گلخانه‌های اختصاصی انجام شود و علیرغم کنترل بسیاری از عوامل، نتایج آن عاری از خطا نخواهد بود. اما مطالعات مولکولی در این زمینه، نتایج قابل قبول و دقیق‌تری را در بازه زمانی کوتاه‌تر ارائه می‌کند. طرح ردیابی مولکولی این قارچ تنها زمانی امکان‌پذیر است که اولاً مطالعات گسترده‌ای روی تاکسون‌های زیرگونه‌ای این قارچ انجام شده باشد، ثانیاً امکان دسترسی به ژنوم موجودات در محیط مورد بررسی با غلظت و کیفیت بالا فراهم گردد. لذا در این زمینه، بررسی‌های متعددی انجام شد و مشخص شد اطلاعات ژنتیکی ثبت شده در منابع علمی معتبر درباره دو فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersic* امکان ردیابی مولکولی این فرم‌های بیمارگر را در جامعه میکروبی خاک فراهم می‌کند. بر اساس مطالعات Hirano و همکارانش (۲۰۰۶) یکی از دقیق‌ترین راه‌های تفکیک جدایه‌های *Fusarium oxysporum* استفاده از واکنش زنجیره‌ای‌پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی است. آغازگرهای ساخته شده قطعه سازنده اندوپلی‌گالاکتروناز (pg1) و اگزو پلی‌گالاکتروناز (pgx4) را تکثیر می‌کند. در تحقیق فوق پس از توالی‌یابی و مقایسه فرم‌های اختصاصی و نژادهای بیمارگر آغازگرهایی برای تفکیک مولکولی آنها طراحی گردیده است. بر این اساس، آغازگر uni به نوعی طراحی شده است که کلیه جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* را مشترکاً از سایر فوزاریوم‌ها جدا می‌کند (Hirano *et al*., 2006). این دو فرم اختصاصی هر دو روی گیاه گوجه‌فرنگی با علائم مشابه، بیماری پژمردگی آوندی را ایجاد می‌کنند. در

حال حاضر این بیماری از مخرب‌ترین بیماری‌های مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی به خصوص در مناطقی مانند ورامین، خوزستان، بوشهر، آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی و اصفهان گزارش شده است (Darvishnia, 2015). لذا این تحقیق با هدف شناسایی و معرفی کاربردی‌ترین روش استخراج DNA، از جامعه میکروبی چندین نمونه خاک مورد مطالعه، طراحی و اجرا گردید، تا از بین روش‌های مختلفی که در منابع علمی به آنها اشاره شده (با برخی تغییرات در آنها) روشی ارائه شود که حاصل آن استحصال DNA از میکروارگانیسم‌های خاک با خلوص بیشتر و غلظت بالاتر باشد. در این پژوهش همچنین تلاش گردید تا با شناسایی و ردیابی مولکولی فرم‌های اختصاصی قارچ خاکزاد *Fusarium oxysporum* بیماریزا روی گوجه فرنگی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بتوان روشی ارائه کرد که پیش از بروز علائم این بیماری، با کاربرد روش‌های مدیریت تلفیقی از ایجاد خسارات عمده در مزارع گوجه فرنگی جلوگیری کرد. با بررسی منابع جامعی که انجام شد، این گزارش برای اولین بار در ایران در خصوص شناسایی و معرفی کارآمدترین روش استخراج مستقیم DNA از جامعه میکروبی خاک و ردیابی مولکولی فرم‌های اختصاصی پاتوژن خاکزاد و بیماری‌زای *Fusarium oxysporum* روی گوجه‌فرنگی ارائه می شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت اجرای این تحقیق، نمونه‌های خاک مورد مطالعه از هفت منطقه مختلف از پارک‌ها و گلخانه‌های استان تهران و البرز جمع‌آوری گردیده که اطلاعات مربوط به آن در جدول شماره ۱ آورده شده است. نمونه‌برداری از عمق صفر تا سانتی‌متر خاک مناطق مورد مطالعه به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. سپس نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده برای ایجاد یک نمونه مرکب، با یکدیگر مخلوط و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول دوره آزمایش نگهداری شد.

جدول ۱. نمونه‌های خاک‌های مورد مطالعه

نمونه خاک	مناطق
S1	تهران، شهرک غرب
S2	تهران، جنت‌آباد
S3	تهران، شهریار
S4	البرز، فردیس
S5	تهران، بوستان حکیم
S6	تهران، خاک سطحی حسین‌آباد
S7	تهران، خاک عمقی حسین‌آباد
S8	تهران، خاک سطحی درکه
S9	تهران، خاک عمقی درکه

استخراج DNA از جامعه میکروبی خاک

در بخش اول این تحقیق برای استخراج DNA جامعه میکروبی خاک مورد مطالعه، سه روش متفاوت طراحی و مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت‌های پایه‌ای تیمارها بین سه روش مورد استفاده در استخراج DNA از جامعه میکروبی خاک در جدول شماره ۲ ارائه شده است که در ادامه به تفکیک هر یک از این روش ها توضیح داده می‌شود. هرکدام از روش‌ها در شرایط برابر حداقل ۵ بار تکرار شد.

جدول ۲. تفاوت تیمارها برای استخراج خاک در سه روش مورد مطالعه

تیمار	مواد اصلی در روش A	مواد اصلی در روش B	مواد اصلی در روش C
شیمیایی	SDS20% CTAB1% 1.5M NaCl	SDS1% 0.1M NaCl	10%SDS 0.15M NaCl برای محلول ۱ 0.1M NaCl برای محلول ۲
آنزیمی	پروتئیناز پتاسیم	-	لیزوزیم
مکانیکی	–	فریز کردن و گرم کردن	فریز کردن و گرم کردن

روش A: در این روش DNA جامعه میکروبی خاک مورد مطالعه، بر اساس تغییرات لازم شامل تغییر در مقدار آنزیم، دمای نگهداری، زمان سانتریفیوژ در پروتکل ارائه شده توسط Zhou و همکاران (۱۹۹۶) که مبتنی بر روشی شیمیایی- آنزیمی است، به شرح مراحل ذیل، طراحی گردید:

A-۱. پنج گرم از نمونه خاک مورد آزمایش با ۱۳/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج (جدول ۳) به همراه ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K ترکیب شد.

A-۲. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۲۵ دور در دقیقه شیک شدند. ۱/۵ میلی‌لیتر SDS ۲۰٪ به مخلوط فوق اضافه شد و برای مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم با درجه حرارت ۶۵ سانتی‌گراد قرار گرفت.

A-۳. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند.

A-۴. لایه رویی به تیوپ جدید انتقال یافته و لایه زیرین طی مراحل بعدی شستشو شدند (با افزودن ۴/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر SDS ۲۰٪ و به مدت ۱۰ ثانیه).

A-۵. مواد حاصل در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد.

A-۶. نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس لایه رویی جمع‌آوری گردید.

A-۷. نمونه‌ها به مدت نیم‌ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

A-۸. سپس نمونه‌ها درون حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند.

A-۹. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شده و سپس فاز رویی جمع‌آوری و به تیوپ جدید منتقل شد.

A-۱۰. به اندازه هم حجم مایع رویی، از محلول کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل به نسبت (۲۴:۱) به نمونه‌ها اضافه و سانتریفیوژ ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام و مجدداً فاز بالایی جمع‌آوری شد.

A-۱۱. ۰/۶ درصد از مجموع حجم فازهای رویی جمع شده، ایزوپروپانول اضافه شده و به مدت نیم ساعت در دمای محیط نگهداری شد.

A-۱۲. نمونه‌ها با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شدند و در این مرحله فاز رویی حذف گردید.

A-۱۲. اتانول ۷۰٪ به میزان ۷۰-۱۰۰ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ۲-۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد.

A-۱۳. در این مرحله اتانول حذف و تیوپ حاوی DNA در دمای محیط خشک شد.

A-۱۴. بعد از خشک شدن نمونه‌ها، ۵۰۰ میکرولیترآب مقطر استریل به نمونه اضافه شد.

جدول ۳. طرز تهیه بافر استخراج در روش A

مواد شیمیایی	مقدار	شرایط تهیه
TrisHcl	100mM	pH=8
Sodium EDTA	100mM	pH=8
Sodium Phosphate	100mM	pH=8
NaCl	1.5M	-
CTAB	1%	-

روش B: این روش بر اساس تغییرات ایجاد شده شامل تغییر در تعداد شوک‌های حرارتی، افزودن مراحل ۱۰ تا ۱۳ و تغییر زمان سانتریفیوژ در پروتکل پیشنهادی Kuske (۱۹۹۷) در خصوص استخراج DNA که مبتنی بر روشی شیمیایی- مکانیکی است، به شرح مراحل ذیل طراحی و اجرا گردید:

B-۱. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از Tens buffer که جدول شماره ۴ آورده شده را به ۵ گرم نمونه خاک اضافه و نمونه‌ها به مدت یک‌ساعت در حمام آب گرم ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

B-۲. ده دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و مایع رویی جمع‌آوری و نگهداری گردید.

جدول ۴- طرز تهیه ۱۰ میلی لیتر TENS buffer در روش B

مواد شیمیایی	مقدار	شرایط تهیه
Tris HCl	50mM	pH=8
disodium EDTA	20mM	pH=8
NaCl	0.1M	-
SDS	1%	-

B-۳. پنج میلی‌لیتر از Tens buffer بدون SDS (جدول شماره ۵) به لایه زیرین اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه و دمای محیط سانتریفیوژ شد.

B-۴. مایع رویی جمع‌آوری و به مایع رویی مرحله قبل اضافه گردید.

B-۵. هفت‌ونیم میلی‌لیتر Tens buffer به لایه زیرین اضافه شد و سپس شوک حرارتی شامل فریزر کردن در دمای ۲۰- سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و انتقال فوری در حمام آب گرم با حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و این روند ۳ بار تکرار گردید.

B-۶. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای محیط سانتریفیوژ شد.

B-۷. مایع رویی حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد.

B-۸. نمونه‌ها در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شد.

B-۹. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ دور و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی مجدداً جمع‌آوری گردید.

B-۱۰. کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) هم حجم مایع رویی جمع شده به آن اضافه گردید و نمونه‌ها با ۶۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی جمع‌آوری گردید.

B-۱۱. ایزوپروپانول، به میزان ۰/۶ درصد ازحجم مایع رویی به نمونه‌ها اضافه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک ساعت نگهداری شد.

B-۱۲. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و پس از حذف فاز رویی با ۷۰- ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد.

B-۱۳. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۲-۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ و سپس لایه زیرین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

B-۱۴. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه‌ها اضافه گردید.

جدول ۵. طرز تهیه Tens buffer در روش B

مواد شیمیایی	مقدار	شرایط تهیه
Tris HCl	50mM	pH=8
disodium EDTA	20mM	pH=8
NaCl	0.1M	-

روش C: این روش استخراج DNA بر اساس تغییرات لازم در روش پیشنهادی Tsai and Olson (۱۹۹۱) که مبتنی بر روش‌های شیمیایی- آنزیمی و مکانیکی است، به شرح مراحل ذیل اجرا گردید:

C-۱. پنج گرم از خاک نمونه مورد مطالعه با ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم‌فسفات ۱۲۰ میلی‌مولار، مخلوط شد (جدول ۶).

C-۲. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۵۰ دور در دقیقه شیک گردید.

C-۳. محلول حاصل با ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دورریخته شد.

C-۴. لایه زیرین با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات شستشو و لایه رویی مجددا دور ریخته شد.

C-۵. به نمونه ها ۱۰ میلی‌لیتر از محلول Lysis 1 اضافه شد (جدول شماره ۶) و آنزیم لیزوزیم به میزان (۱۵ میلی‌گرم در ۱ میلی لیتر آب مقطر) اضافه گردید.

C-۶. نمونه‌ها درون حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفتند.

C-۷. ده میلی‌لیتر از محلول Lysis 2 به مخلوط فوق اضافه گردید.

C-۸. به ترتیب، نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در ۲۰- سانتی‌گراد فریز و بلافاصله در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه قرار گرفتند و این مرحله سه بار تکرار شد.

C–۹. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه با دمای محیط، سانتریفیوژ شدند و فاز رویی آنها استحصال شد.

C–۱۰. هم حجم مایع رویی حاصل، کلروفرم–ایزوآمیل‌الکل اضافه و در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی جمع‌آوری گردید.

C–۱۱. شش‌دهم درصد ازحجم مایع رویی، ایزوپروپانول اضافه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد.

C–۱۲. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و دمای محیط، مایع رویی حذف شد.

C–۱۳. اتانول ۷۰٪ شستشو شد و به مدت ۲ تا ۵ دقیقه با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

C–۱۴. اتانول حذف و لایه زیرین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط انکوباتور خشک شد.

C–۱۵. به نمونه‌ها ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

جدول ۶ محلول‌ها و بافر مورد استفاده روش C

محلول‌ها و بافر	مواد و اجزاء تشکیل‌دهنده	مقدار	شرایط
بافرسدیم فسفات	۱۲۰mM سدیم فسفات	10ml	pH=8
Lysis1	0.15 M NaCl 0.1M disodium EDTA	10ml	pH=8
Lysis2	0.1M NaCl 0.5M Tris- HCl 10% SDS	10ml	pH=8
Lysozyme	–	15mg/ml	نگهداری روی یخ

ارزیابی کیفیت و کمیت DNA

به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA، تکنیک‌های زیادی برای تمایز و تشخیص اسیدهای نوکلئیک وجود دارد از جمله الکتروفورز که روشی سریع و نسبتاً ارزان است. همچنین می‌توان DNA را از لحاظ اندازه، سالم بودندر مطالعات قبلی کیفیت و کمیت DNA بررسی شده بر اساس گزارش Sambrook و همکاران (۱۹۸۹) با استفاده از یک اسپکتروفتومتر (UV-1601, *Shimadzu*) و با محاسبه نسبت A260/A280, A260/A230 تخمین زده شد. این روش بر این اصل استوار است که اسیدهیومیک، فنل و سایر ترکیبات آروماتیک که همزمان استخراج شده‌اند، در ۲۳۰ نانومتر بیشترین طیف جذبی را دارند، در صورتی‌که DNA در ۲۶۰ نانومتر و پروتئین در۲۸۰ نانومتر جذب می‌شود. نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ (۱/۸–۲) نشان‌دهنده خلوص DNA است و هر چه این نسبت از ۱/۸ کوچک‌تر باشد، آلودگی بیشتر DNA با پروتئین یا فنل را نشان می دهد و نسبت بزرگ‌تر از ۲ دلیل وجود RNA در نمونه است (Yeates *et al*., 1998). دستیابی به اطلاعات فوق با پیشرفت علمی و دسترسی به دستگاه نانودراپ با دقت و سرعت بیشتری امکان‌پذیر است. در این تحقیق با سه روش مختلف جداسازی DNA جمعیت میکروبی از خاک صورت گرفت. به منظور ارزیابی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ ND 1000 شرکت Termo استفاده گردید. این دستگاه قابلیت اندازه‌گیری غلظت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک و پروتئین از 2ng/ml تا 3700ng/ml بدون نیاز به رقیق‌سازی نمونه در محدوده طول موج ۱۹۰–۸۴۰ نانومتر و دقت جذب نوری ۰/۰۰۳ را دارد.

ردیابی مولکولی بیمارگر خاکزاد *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*

در بخش دوم این تحقیق، بر اساس مطالعات Hirano و همکارانش (۲۰۰۶) که یکی از دقیق‌ترین راه‌های

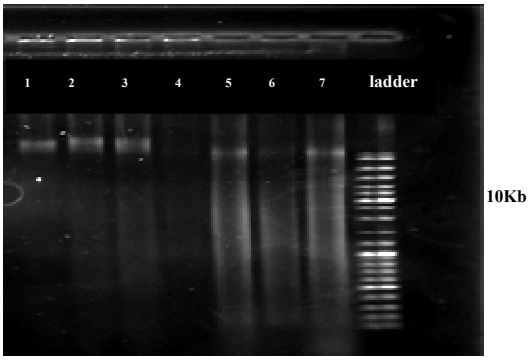
تفکیک جدایه‌های *Fusarium oxysporum* را استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر اختصاصی uni معرفی کرده، ردیابی مولکولی فرم‌های اختصاصی بیمارگر خاکزاد *Fusarium oxysporum* بیماری‌زا روی گوجه‌فرنگی انجام گرفت. مطالعات گسترده ژنتیکی و مولکولی انجام شده روی این بیمارگر خاکزاد و توالی‌یابی کامل ژنوم این قارچ از طرفی و طراحی آغازگر اختصاصی برای ردیابی و شناسایی فرم‌های اختصاصی بیماری‌زا روی گوجه‌فرنگی و خسارت عمده ایجاد شده توسط این بیمارگر در مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی و دسترسی به DNA جامعه میکروبی خاک، امکان بررسی و ردیابی مولکولی این قارچ را در نمونه DNA موجود فراهم نمود. برای این کار از آغازگر اختصاصی uni با قابلیت تفکیک *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* و از سایر بیمارگرهای خاکزاد، استفاده شد. برای تهیه ۲۵ میکرولیتر مخلوط اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به ترتیب از ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer، ۰/۸۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۲ میکرولیتر DNA استفاده شد. جهت انجام این واکنش آغازگر اختصاصی uni ساخت شرکت MWG مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۷). برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی اجرا شده عبارت است از: چرخه نخست، دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه بعدی شامل، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه در دستگاه ترموسایکلرگرادیانت Bio rad مدل Mycycler^{TM} انجام گرفت. این واکنش برای هر یک از نمونه ها ۵ بار تکرار شد و برای بررسی تکثیر قطعه ژن مورد نظر، از الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE استفاده گردید.

جدول۷. مشخصات آغازگر مورد استفاده در این تحقیق

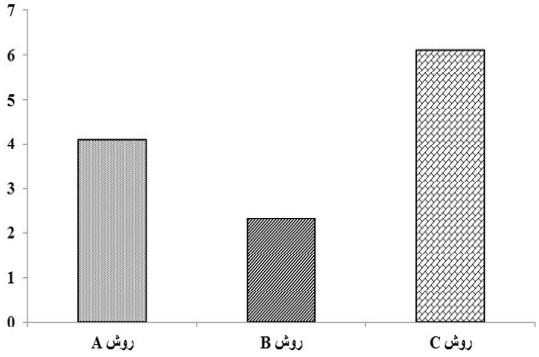
Primers	Melting Point (°c)	Sequence
uni f	55.9	5´ATCATCTTGTGCCAACTTCAG 3´
uni r	56.5	5´GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA 3´

نتایج و بحث

پس از انجام دقیق روش‌های ذکر شده، حضور DNA به دست آمده برای هریک از روش‌ها با آنالیز باندها پس از الکتروفورز DNA خام از ۵ تکرار در شرایط برابر، تایید شد (شکل ۱). نتایج حاصل از مطالعه محصول DNA در نمونه‌های خاک مورد مطالعه با استفاده از سه روش یاد شده، به وسیله دستگاه نانودراپ نشان داد که میانگین غلظت، برای روش B، A و C به ترتیب ۲/۳۲، ۴/۱ و ۶/۱ نانوگرم بر میکرولیتر DNA رقیق شده در حجم برابر آب مقطر است (شکل ۲).



شکل ۱. الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده به روش‌های A، B و C در شرایط برابر در یک نمونه خاک. چاهک ۱: روش A، چاهک‌های ۲ و ۳: روش C و چاهک‌های ۴، ۵، ۶ و ۷: روشB و چاهک ۸: GeneRuler DNA Ladder Mix شرکت Fermentas.



شکل ۲. میانگین غلظت‌های DNA استخراج شده بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر DNA رقیق شده در آب مقطر از یک نمونه خاک با سه روش مورد مطالعه در ۵ تکرار

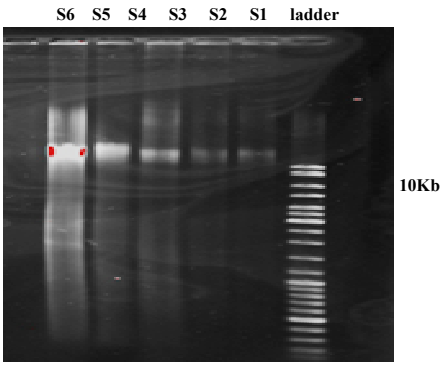
با توجه به اینکه نمونه خاک مورد آزمایش در هر سه روش یکسان بوده است، غلظت DNA به دست آمده با استفاده از روش استخراج آنزیمی سلول (روش A و C) بیشتر از روش شیمیایی- مکانیکی (روش B) بود. تکرارهای متعدد روش های A، B و C با نمونه خاک‌های دیگر نیز به خوبی نشان داد، حداکثر غلظت DNA با روش C بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر قابل استحصال است. این نتایج تاییدی بر مطالعات انجام شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۳) بود که نشان داده بود، محصول‌دهی بیشتر روش‌های آنزیمی در نتیجه هضم دیواره توسط لیزوزیم است که می‌تواند به طور موثری دیواره سلولی میکروارگانیسم را شکسته و DNA را به راحتی آزاد کند (Zhang *et al*., 2003).

فاکتور مورد ارزیابی دیگر این تحقیق خلوص DNA استخراج شده از نظر آلودگی به پروتئین در روش‌های ذکر شده بود که با اندازه‌گیری نسبت جذب طول موج‌های ۲۶۰ به۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. متوسط نسبت جذب DNA به پروتئین برای روش A ۱/۳۵، برای روش B ۱/۱۸ و برای روش C ۱/۶۱ گزارش می‌شود. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که DNA استخراج شده به روش C (مبتنی بر روش‌های شیمیایی- آنزیمی و مکانیکی) کمترین میزان آلودگی به پروتئین را نشان داد و کارایی این روش را در مقایسه با سایر روش‌ها در حذف آلودگی‌ها تایید کرد. از طرف دیگر متوسط نسبت جذب DNA به پروتئین برای روش B (مبتنی بر روش‌های شیمیایی- مکانیکی) بطور مقایسه‌ای کمتر از دو روش A و C بود. به عبارت دیگر روش B کارایی کمتری در حذف آلودگی‌ها و استخراج مناسب DNA از جامعه میکروبی خاک نشان داد. همچنین مشاهده شد که میانگین نسبت‌های جذبی طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، DNAی تمام نمونه‌های خاک مورد مطالعه در هر سه روش مورد مطالعه بیشتر از یک است لذا می‌توان گفت که DNA استخراج شده توسط هر سه روش، دارای مقدار کمی ناخالصی از جمله هیومیک‌اسید و پروتئین می‌باشد.

در این آزمایش تکنیک‌های آنزیمی در مورد استخراج سلولی و خلوص DNA بهترین نتایج را نشان دادند. کیفیت بهتر DNA با وزن مولکولی و خلوص بالا با روش C به دست آمد. این مورد ممکن است به دلیل ترکیب تکنیک استخراج شیمیایی/ آنزیمی/ مکانیکی باشد که می‌توانست محصول DNA بیشتری را بدون شکستن شدید ارائه دهد که این موضوع با مطالعات Tsai و Olson (۱۹۹۱) مطابقت نشان داد. دلیل دیگری به این نتایج می‌توان نسبت داد این است که عملیات فریز کردن-گرم کردن می‌تواند منجر به آسیب مشخصی به اسید نوکلئیک به خصوص مولکول‌های DNA خطی بزرگ مثل DNA کروموزومی یوکاریوت‌ها شود. پیش از این Liesack و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که هموژنایز کردن و سایر روش‌های مکانیکی مثل سونیکاسیون به طور کلی منجر به شکستن شدید DNA می‌شوند. لذا به کارگیری جزئیات روش C، بهترین انتخاب برای استخراج DNA کل جامعه میکروبی از نمونه‌های خاک مورد مطالعه در نظر گرفته شد چرا که پروفایل‌های جذب UV نشان داد DNA استخراج شده علاوه بر غلظت بالا، نسبتاً

عاری از ترکیبات چسبنده خاک مثل هیومیک اسیدها و آلودگی‌های پروتئین بود. همچنین روش C برای استخراج DNA جمعیت میکروبی از خاک‌های مختلف، قابل اطمینان و سریع است. با توجه به تکرارهای متعدد این آزمایش و نتایج قابل قبول روش C (استخراج شیمیایی- آنزیمی- مکانیکی) می‌توان نسبت به طراحی و ساخت کیت استخراج DNA در داخل کشور و جنبه‌های کاربردی این تحقیق پیشنهادهای لازم را ارائه کرد.

در بخش ردیابی مولکولی فرم‌های اختصاصی بیمارگر خاکزاد *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *F. oxysporum* f. sp. radicis *lycopersici* پس از دستیابی به روش مناسب استخراج DNA از جامعه میکروبی خاک، از نمونه خاک‌های مورد بررسی (جدول شماره ۱)، DNA با روش C استخراج گردید (شکل شماره ۳).



شکل ۳. الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده به روش C در برخی از نمونه‌ها.

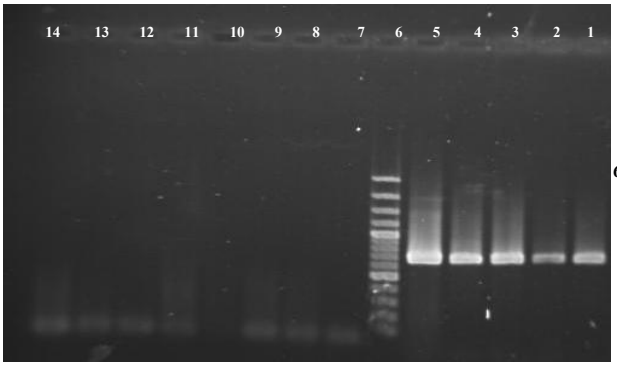
از سمت راست به ترتیب چاهک ۱: GeneRuler DNA Ladder Mix شرکت Fermentas. چاهک ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ به ترتیب: نمونه‌های S1، S2، S3، S4، S5، S6 در ژل اگارز ۰/۸ درصد (بافر TBE، ولتاژ ۱۰۰، ´۶۰).

اختصاصی بودن پرایمر مورد استفاده امکان ردیابی این پاتوژن را در حد فرم اختصاصی فراهم نموده است. در صورت تعدد پاتوژن‌ها نیاز به سکوئنس سایر پاتوژن ها و دسترسی به قطعات ژن خاص که قابلیت تفکیک این پاتوژن‌ها را دارا باشند، می‌باشد که مطالعات گسترده تاکسونومی مولکولی قارچ‌ها را می‌طلبد. و از حد این تحقیق خارج است. انتخاب این پاتوژن در این تحقیق به سبب گسترده بودن مطالعات انجام شده روی این قارچ و در اختیار بودن پرایمر اختصاصی برای ردیابی بوده است.

مطالعات گسترده مولکولی انجام شده روی این بیمارگر و توالی‌یابی کامل ژنوم این قارچ از طرفی و خسارت عمده ایجاد شده توسط این پاتوژن در مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی، امکان بررسی و ردیابی مولکولی این قارچ را در نمونه DNA موجود فراهم نمود. برای این کار آغازگر اختصاصی uni با قابلیت تفکیک *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* از سایر بیمارگرهای خاکزاد، استفاده شد. به منظور ردیابی مولکولی قارچ فوزاریوم تمامی نمونه DNAهای استخراج شده در ۵ تکرار طبق برنامه حرارتی ذکر شده، با آغازگر اختصاصی تحت واکنش PCR قرار گرفتند و بررسی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر TBE در نمونه خاک‌های S1–S9 نشان داد که تنها نمونه S1 با ۵ تکرار دارای آلودگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی است. الگوی الکتروفورزی این واکنش با تشکیل باندی به وزن حدود ۶۷۲ bp موید این مطلب است (شکل شماره ۴).

در نتیجه این خاک حاوی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* یا *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* و یا هردو فرم اختصاصی می‌باشد. وجود هر یک از این دو در خاک، می‌تواند نشان آلودگی خاک و ایجاد بیماری پژمردگی آوندی در بوته‌های گوجه‌فرنگی باشد. آغازگر مورد استفاده هر دو فرم اختصاصی را مشترکاً جداسازی می‌کند. راه‌های متفاوتی برای تفکیک این دو فرم نیز از یکدیگر وجود دارد که از بحث این مقاله خارج بوده و می‌تواند به عنوان یک

موضوع تحقیق جدید مطرح گردد. لکن با وجود ایجاد علائم مشترک، با ردیابی عامل بیماری در خاک، آلودگی فوزاریومی، قبل از کاشت گیاه و بروز علائم بیماری قابل تشخیص بوده و این امکان را فراهم می‌آورد که بتوان نسبت به حذف عامل بیماری به روش‌های مختلف یا کاشت واریته مقاوم و انتخاب میزبان غیرحساس اقدام نموده و خسارت اقتصادی ناشی از این بیماری قارچی را کاهش داد. در مابقی نمونه‌ها باندی که بیانگر آلودگی به قارچ فوق باشد، مشاهده نشد (شکل شماره ۳). این نتایج ضمن تایید حضور پاتوژن در نمونه خاک S1 تاییدی بر این امر بود که DNA استخراج شده از جامعه میکروبی خاک، قابلیت اتصال و تکثیر قطعه ژن مورد نظر تحت واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر را دارا می‌باشد.



شکل ۴. الگوی الکتروفورزی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نمونه‌ها، از سمت راست: چاهک ۱ تا ۵ نمونه S1، چاهک۶ GeneRuler DNA Ladder Mix: شرکت Fermentas. چاهک‌های ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ به ترتیب نمونه‌های S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 روی ژل آگارز ۱/۲ درصد (بافر TBE، ولتاژ ۱۰۰، ۶۰ ْ) نتایج PCR نمونه S1 با ۵ تکرار، بیانگر آلودگی نمونه خاک آن منطقه می‌باشد. در مابقی نمونه‌ها باندی که بیانگر آلودگی به بیماری فوق باشد، دیده نشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق و همکاران محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی سرکار خانم دکتر بدری و سرکار خانم مظفری که شرایط این تحقیق را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Ahmadikhah A (2012) Genetic Engineering. Gorgan University of Agriculture Sciences & Natural resources, Iran.

Darvishnia M, Dehghani A (2015) Diseases of vegetable crops in Iran and their integrated Management, Lorestan University, Iran.

Ebrahimi MA, Tohifar M, Ahmadinik I (2014) Principles of Genetic Engineering. Payame Noor University, Iran.

Burgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J (2001) A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. J. Microbial. Methods 45: 7-20.

Courtois S, Frostegard AS, Goransson P (2001) Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. Environ. Microbiol. 7:431- 439.

De Lipthay JR, Enzinger C, Johnsen K, Aamaand J, Sorensen SJ (2004) Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. Soil Biol. Biochem.

36: 1607-1614.

Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC (2015) Comparative evaluation of DNA extraction methods from feces of multiple host species for downstream next-generation sequencing. PLoS ONE 10(11): e0143334. doi:10.1371/journal.pone.0143334.

Hirano Y, Arie T (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. lycopersici and radicis-lycopersici and races of *F. oxysporum* f. sp. lycopersici. J. Gen. Plant Path. 72: 273-283.

Islam MR, Trivedi P, Palaniappan P, Reddy MST (2009) Evaluating the effect of fertilizer application on soil microbial community structure in rice based cropping system using fatty acid methyl esters (FAME) analysis World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1115-1117.

Knietsch A, Waschkowitz T, Bowien S, Henne A, Daniel R (2003) Metagenomics of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli.* J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 5: 46-56.

Liesack W, Weyland H, Stackebrandt E (1991) Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16s rDNA analysis of a mixed–culture of strict barophilic bacteria: Microb. Ecol. 21: 191-198.

Luna GM, Dell Anno A, Danaovaro R (2006) DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial assessment in marine sediments. Environ. Microbiol. 8: 308-320.

Luo H, Qi H, Xue K, Zhang H (2003) A preliminary application of PCR–DGGE to study microbial diversity in soil. Acta Ecologica Sini. 23: 1570-1575.

Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel TM (2003) Extraction of DNA from soil. Eur. J. Soil Biol. 39: 183-190.

Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Appl. Soil Ecol. 18: 47-60.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 5: 240-245.

Yeates C, Gilling MR, Davision AD, Altavilla N, Veal DA (1998) Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biol. Proc. Online 1: 40-47.

Zhou JZ, Mary AB, James MT (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Appl. Environ. Microbiol. 62: 316-322.

Zhang R, Cao H, Cui Z, Li S, Fan, B. 2003. Extraction and purification of soil microbial total DNA. Acta Microbiol. Sini . 43: 276-282.