جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

روش‌های آزمایشگاهی شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها و باکتری‌ها

نگارندگان

حسین کاری دولت‌آباد، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
وحیداله جهاندیده مهجن‌آبادی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 640

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های آزمایشگاهی شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها و باکتری‌ها

نگارندگان: حسین کاری دولت‌آباد و وحیداله جهاندیده مهجن‌آبادی

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64785 در تاریخ 1402/11/8 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 026 -36201900

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

1- مقدمه 1
2- شناسایی مولکولی قارچها و باکتری‌ها 2
2-1- شناسایی مولکولی قارچها 4
2-1-1- شناسایی مولکولی قارچهای اندوفیت 5
2-1-1-1- تهیه میسلیوم قارچهای اندوفیت 5
2-1-1-2- استخراج DNA ژنومی قارچهای اندوفیت 5
2-1-1-3- تکثیر ناحیه ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 6
2-1-1-4- الکتروفورز ژل آگارز 9
2-1-2- شناسایی مولکولی قارچهای میکوریز 13
2-1-2- 1- استخراج DNA ژنومی قارچهای میکوریز 13
2-1-2-2- تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای 13
2-2- شناسایی مولکولی باکتری 15
2-2-1- استخراج DNA ژنومی باکتری 15
2-2-2- تکثیر ناحیه ژنومی 16S rDNAتوسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 15
2-3- تجزیه و تحلیل نتایج شناسایی مولکولی 16
3- بررسی تنوع ژنتیکی قارچها و باکتری‌ها 16
3-1- روش‌های واکنش زنجیرهای پلیمراز بر اساس عناصر پالیندرومی خارج ژنی تکراری 19
3-1-1- آزمون BOX-PCR 17
3-1-2- آزمون REP-PCR 19
3-1-3- آزمون ERIC-PCR 21
3-2- روش DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) 23
3-3- روش چند شکلی طول قطعات حاصل از برش (RFLP) 26

3-4- روش چندشکلی نواحی تکرای ساده میانی (ISSR) 33
3-5- تجزیه و تحلیل نتایج تنوع ژنتیکی 31
فهرست منابع 31

1- مقدمه

قارچ‌ها و باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد استفاده شده در کودهای زیستی ریزجانداران مفیدی هستند که با سازوکارهای متفاوت به صورت مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش رشد، عملکرد و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. با اینکه در سال‌های اخیر به کودهای زیستی توجه بیشتری شده و چندین کارخانه بزرگ و کوچک به تولید کودهای زیستی در کشور همت گماشته‌اند اما یکی از مشکلات کودهای زیستی در ایران عدم شناسایی دقیق ریزجانداران استفاده شده در تولید این نوع از کودها است. شناسایی نشدن دقیق گونه ممکن است به‌دلیل نقصان روش‌های شناسایی در قارچ‌ها و باکتری‌ها باشد.

روش‌های اولیه تشخیص و طبقه‌بندی قارچ‌ها و باکتری‌ها بر اساس تشابه در خواص فنوتیپی و یا ریخت‌شناسی آن‌ها استوار بوده‌اند. در این روش‌ها گاهی گونه‌های قارچی بر اساس تعداد معدودی از ویژگی‌ها مانند رنگ پرگنه، نوع کنیدیوفور و کنیدی تولید شده، روش کنیدی‌زایی، تولید ساختارهای جنسی و ویژگی‌های آن‌ها تفکیک می‌شدند. در گونه‌های باکتریایی، رنگ سلول در اثر رنگ‌آمیزی گرم یا دیگر رنگ‌ها، ریخت‌شناسی، تحرک، نیازهای تغذیه‌ای، تولید اسید، تشکیل اسپور یا تولید رنگدانه تا حدودی باعث شناسایی و رده‌بندی باکتری‌ها می‌شد. این روش‌ها شاید یک روش برای تشخیص برخی از انواع گونه‌ها باشند ولی برای شناسایی تمام گروه‌ها، قابل استفاده نیستند. گرچه این روش‌ها در زمان خود موفق بودند ولی دقت کافی برای تشخیص ریزجاندارانی که از نظر ویژگی‌های ظاهری و فیزیولوژی به هم شبیه بودند را نداشتند. در بررسی‌های بعدی مشخص شد که روش‌های پیشین کارآیی کافی را برای طبقه‌بندی قارچ‌ها و باکتری‌ها ندارند و می‌توانند سبب اشتباهات جدی شوند. از سوی دیگر روش‌های سنتی پر زحمت و وقت‌گیر هستند و شناسایی گونه‌های ریزجانداران بـا روش‌های ریخت‌شناسی و میکروسکوپی با توجه به تفاوت‌های بسیار جزئی آن‌ها مستلزم مهارت و تجربه زیادی است. همچنین ویژگی‌های ریخت‌شناسی تحت تأثیر شرایط محیطی نظیر دما و رطوبت ممکن اسـت تغییر کنند. این مسایل اهمیت استفاده از روش‌های دیگر مانند روش‌های مولکولی که از حساسیت و سرعت بالایی برای شناسایی ریزجانداران برخوردار هستند را مشخص می‌کند و این روش‌ها

می‌توانند برای تشخیص نهایی گونه به کارگرفته شوند. در شناسایی مولکولی بسته به جنس و گونه ممکن است از یک یا چند ژن برای شناسایی استفاده شود. بدلیل اینکه استفاده از یک ناحیه ژنی ممکن است تنها امکان شناسایی تا سطح جنس را دهد و توانایی شناسایی دقیق گونه را نداشته باشد، استفاده ترکیبی از روش‌ها و یا چند ژن کمک‌کننده است (ادا و همکاران، 1999؛ مارتنس و همکاران، 2008؛ بوزفسکی و همکاران، 2017؛ اگارتنر و همکاران، 2017). در این دستورالعمل سعی شده است به روش‌های شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچی و باکتری پرداخته شود.

2- شناسایی مولکولی قارچ ها و باکتری‌ها

شناسایی و طبقه‌بندی ریزجانداران بر پایه‌ی توالی ژن‌های حفاظت شده‌ی آن‌ها انجام می‌شود. از مهمترین آن‌ها، نواحی ژنی ریبوزومی است که برای بررسی نزدیکی و رده‌بندی باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده می‌شود. در این توالی‌های حفاظت‌شده امکان جهش یا انتقال افقی در ژن‌های اجزای دستگاه‌های بزرگ مولکولی چون ریبوزوم وجود ندارد، زیرا این اجزا میانکنش‌های پیچیده‌ای با یکدیگر دارند که طی میلیون‌ها سال با یکدیگر به تکامل رسیده‌اند و تغییری کوچک در توالی آن‌ها می‌تواند تغییرات ساختمانی بزرگ و ناکارآمدی بوجود آورد. این نواحی ژنی به‌طور گسترده در طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده می‌شوند. این نواحی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1] تکثیر شده و پس از بررسی کمیت و کیفیت آن، تعیین توالی می‌شوند. توالی بدست آمده از یک جدایه با توالی‌هایی از انواع سویه‌ها از تمام گونه‌ها در پایگاه داده‌های آنلاین مختلف از جمله NCBI مقایسه می‌شود که یک راه دقیق و مناسب برای شناسایی مولکولی ریزجاندار موردنظر است. با این وجود در بسیاری از گونه‌های مختلف یک جنس به دلیل شباهت بالای این نواحی ژنی، استفاده از روش چند ژنی (MLSA)[2] و مقایسه چندین ژن نیز کاربرد زیادی دارد. ژن‌های استفاده شده و تعداد ژن مورد نیاز برای شناسایی باکتری‌ها، قارچ‌ها و یا رده‌بندی آن‌ها بسته به نوع جنس باکتری و یا قارچ متفاوت است.

[1] Polymerase chain reaction
[2] Multilocus sequence analysis

دو راهکار برای انتخاب DNA هدف وجود دارد: 1) شناسایی ژن‌های حفاظت شده شناخته شده با تنوع کافی در داخل ژن‌ها و بین آن‌ها 2) اسکرین تصادفی بخش‌هایی از ژنوم برای پیدا کردن نواحی که اختصاصیت کافی نشان می‌دهند. اغلب نواحی معمول حفاظت شده در تشخیص ریزجانداران، DNA ریبوزومی است (وایت و همکاران، 1990). ناحیه یادآوری شده دارای تعداد زیادی از ویژگی‌های مفید شامل حضور در همه ریزجانداران با تعداد کپی زیاد است که اجازه تشخیص‌های بسیار حساس را می‌دهد. نواحی پلی‌مورفیسم اغلب با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده و آنالیز محصولات پی‌سی‌آر قابل شناسایی هستند که تفاوت بین استرین‌ها را مشخص می‌کند. کاوشگرها همچنین می‌توانند از محصولات تکثیر شده تولید و در تشخیص استفاده شوند (وارد و گری، 1992). اغلب آغازگرهای اختصاصی تاکسون‌ها از روی محصولات تکثیر شده طراحی می‌شوند تا بتوانند توالی منحصر به فرد و خاصی از DNA را در ریزجانداران هدف قرار دهند. زمانی که تنوع در توالی rDNA برای ایجاد تشخیص‌های اختصاصی تاکسون مناسب نیست دیگر نشانگرها مانند ژن‌های β-tubulinبکار گرفته می‌شوند (فراجی و همکاران، 2001). این نشانگرها این عیب را دارند که دارای یک کپی در ژنوم هستند. از این‌رو حساسیت ردیابی آن‌ها پایین است.

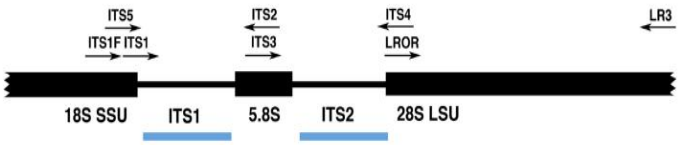
نشانگرهای تشخیص ژنتیکی همچنین ممکن است از غربالگری نواحی تصادفی ژنوم برای پیدا کردن توالی‌هایی که در تاکسون‌های ویژه منحصر به فرد هستند، بدست آید. پس از این قطعه‌هایی از ژنوم ریزجاندار کلون شده و هر کلون به‌عنوان یک کاوشگر در برابر ژنوم‌های مربوطه استفاده می‌شود تا قطعه‌ای که در تاکسون منحصر به فرد است، پیدا شود. کلون‌های ویژه سپس تعیین توالی شده و برای طراحی آغازگرهای اختصاصی استفاده می‌شوند (هنسن، 1989). توالی‌های تکراری از ژنوم در طراحی آغازگرهای اختصاصی می‌توانند بکار برده شوند. مارکرهای با پایه پی‌سی‌آر که به شکل معمول استفاده می‌شوند RAPD، ISSR و Rep هستند.

محصولات تکثیر شده سپس روی ژل الکتروفورز برده و الگوهای باندی جدایه‌های مختلف مقایسه می‌شوند. باندهای تشخیص داده شده ممکن است سپس تعیین توالی شده و در طراحی آغازگرهای اختصاصی که توالی آن‌ها از راه نواحی تکثیری مشخص شده‌اند، بکار برده شوند (نیکلسون و همکاران، 1998).

2-1- شناسایی مولکولی قارچ‌ها

در جدایه‌های قارچی، rDNA هسته‌ای از واحدهای تکراری تشکیل شده است که شامل سه زیر واحد کوچک 18S، زیر واحد 5.8S و زیر واحد بزرگ 28S است. این سه زیر واحد توسط نواحی جداکننده درون ژنی ITS1 و ITS2 از هم جدا می‌شوند. هر واحد تکرارشونده از واحد مجاورش توسط نواحی جداکننده بین ژنی (IGS) جدا می‌شود. در جدایه‌های قارچی بسته به سطوح رده‌بندی از نواحی ژنی 18S rDNA، 28S rDNA و ITS استفاده می‌شود. در ناحیه 18S rDNA تکامل به‌کندی انجام می‌شود و از این‌رو مناسب برای رده‌های بالای طبقه‌بندی مانند سطوح راسته و خانواده است. در ناحیه 28S rDNA نرخ تکامل بیشتر از 18S rDNA و کمتر از ITS است از این‌رو برای سطوح رده‌بندی متوسط یعنی سطح جنس مناسب است. در ناحیه ITS نرخ تکامل بالا بوده و برای سطوح رده‌بندی گونه و DNA Barcoding مناسب است (رجا و همکاران، 2017). در اشکال 1 و 2 نواحی ژنی 18S rDNA، 28S rDNA و ITS و نام آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر این نواحی نشان داده شده‌اند.

شکل 1- نواحی 18S rDNA و 28S rDNA در جدایه‌های قارچی و آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر آن‌ها (رجا و همکاران، 2017).



شکل 2- نواحی ITS در جدایه‌های قارچی و آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر آن‌ها (رجا و همکاران، 2017).

2-1-1- شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت

2-1-1- 1- تهیه میسلیوم قارچ‌های اندوفیت

برای تهیه میسلیوم قارچ‌ها از دو روش می‌توان استفاده نمود.

1- استفاده از محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز (PDB[1]): مقدار 50 میلی‌لیتر از محیط غذایی PDB در ظروف ارلن مایر 100 میلی‌لیتری ریخته و درب آن‌ها با پنبه سترون مسدود شود. پس از سترون نمودن محیط غذایی به مدت 20 دقیقه داخل اتوکلاو با دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر، هر یک از ارلن‌ها توسط سه قرص به قطر پنج میلی‌متر که از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه مورد نظر تهیه شده‌اند، مایه‌زنی شود. ارلن‌های مایه‌زنی شده بر حسب سرعت رشد جدایه‌ها، به مدت 12 الی 14 روز روی دستگاه شیکر با سرعت 100 دور در دقیقه قرار داده شوند. پس از طی مدت زمان لازم، برای برداشت توده میسلیومی از پمپ خلاء و شستشو با آب مقطر سترون استفاده شود. برای خشک نمودن توده‌های میسلیوم، شیشه‌های دارای توده میسلیوم با درب باز به مدت دو تا سه روز درون دستگاه خشک‌کن با سرما [2] قرار داده شوند. میسلیوم‌های خشک شده در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شوند.

2- استفاده از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA): در این روش نخست قارچ روی محیط کشت PDA رشد داده می‌شود. تشتک‌های پتری به مدت دو هفته در دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری و پس از رشد کافی پرگنه، با استفاده از اسکالپل تمیز و سترون، بافت قارچی از روی آن خراش داده شده و مستقیماً به درون هاون‌های چینی سترون منتقل شده و برای استخراج DNA استفاده می‌شوند.

2-1-1-2- استخراج DNA ژنومی قارچ های اندوفیت

میسلیوم هر یک از جدایه‌ها درون هاون چینی با ازت مایع کوبیده شود. پس از تبدیل به پودری نرم، DNA آن‌ها به روش CTAB با کمی تغییرات به شرح زیر استخراج می‌شود

[1] Potato dextrose broth
[2] Freeze dryer

(دویل و دویل، 1987). درون هر هاون چینی محتوی میسلیوم کوبیده شده، مقدار 600 میکرولیتر از بافر استخراج (شامل CTAB: 2%، NaCl: 1/4 M، EDTA: 20 mM و Tris: 100 mM) ریخته شود. سپس محتویات داخل هاون (دارای هیف قارچ و بافر استخراج) به تیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری انتقال داده شود. تمام این مراحل در حمام یخ انجام شود. برای از بین بردن چربی‌ها و پروتئین‌ها مقدار یک میکرولیتر مرکاپتواتانول[1] به تیوب‌ها اضافه شود. سپس تیوب‌ها به مدت 45 دقیقه در حمام آب گرم در دمای 65 درجه سلسیوس قرار گیرند و هر پنج دقیقه یک بار به خوبی تکان داده شوند. به هر تیوب 500 میکرولیتر مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به نسبت 1:24 (برای تهیه 100 میلی‌لیتر از محلول، مقدار 96 میلی‌لیتر کلروفرم و 4 میلی‌لیتر ایزوآمیل الکل مخلوط شوند) اضافه شود و چند بار (20-25 بار) تیوب‌ها به آرامی وارونه شوند تا مخلوط شیری رنگ شود. سپس تیوب‌ها در 13000 دور در دقیقه به مدت 8 دقیقه سانتریفیوژ شوند. فاز بالایی را به آرامی برداشته و به تیوب جدید منتقل شود و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد (20- درجه سلسیوس) اضافه و به مدت یک ساعت در یخچال نگهداری و سپس سانتریفیوژ به مدت 10 دقیقه در 13000 دور در دقیقه انجام شود. در مرحله بعد 500 میکرولیتر اتانول 70 درصد سرد به آرامی در تیوب ریخته و به مدت دو دقیقه در 13000 دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شود. پس از شستشوی DNA، اتانول را خارج کرده و تیوب‌ها را وارونه گذاشته تا در محیط خشک شوند. در پایان برای حل کردن DNA، 50 میکرولیتر بافر TE[2] به تیوب‌ها اضافه کرده و پس از حل شدن، DNA ها در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شوند.

2-1-1-3- تکثیر ناحیه ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای در نمونه‌های بررسی شده، از ترکیب آغازگرهای ITS1 به همراه ITS4 به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم[3] و معکوس[4] استفاده می‌شود. تکثیر با استفاده از ترموسایکلر انجام می‌شود. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها به ترتیب

[1] - 2-Mercaptoethanol
[2] Tris-EDTA
[3] Forward
[4] Reverse

5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' و5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'
است (وایت و همکاران، 1990). تکثیر قطعاتی از DNA ژنومی در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) در حجمی معادل 25 میکرولیتر برای هر نمونه همانند جدول 1 انجام می‌شود.

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

برای این منظور، نخست همه مواد جدول 1 (برای تعداد واکنش‌های مورد نیاز) به غیر از DNA الگو، درون یک لوله سترون 1/5 میلی‌لیتری مخلوط می‌شوند (PCR mester mix). مخلوط حاصل به مدت سه ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس هم زده می‌شود، تا مواد واکنش و به ویژه آنزیم DNA پلی‌مراز به‌خوبی مخلوط شوند.

جدول 1- مقادیر حجمی مواد استفاده شده (مجموع 25 میلی‌لیتر) برای انجام یک واکنش PCR برای تکثیر ناحیه ITS از rDNA هسته‌ای.

مواد به‌کار رفته در واکنش PCR	غلظت نهایی	مقدار مصرفی (میکرولیتر)
آب دیونیزه سترون	-	18/2
بافر پی سی آر (10X)	1X	2/5
کلرید منیزیم (50 میلی‌مولار)	2 میلی‌مولار	1
دئوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات (10 میلی‌مولار)	0/4 میلی‌مولار	1
آغازگر (10 میکرومولار)	0/4 میکرومولار	1
آنزیم Taq DNA Polymerase (5 واحد در میکرولیتر)	1/5 واحد	0/3
DNA	50-40 نانوگرم	1

تعداد واکنش بستگی به تعداد نمونه‌های DNA دارد. معمولاً برای خطای میکروپیپت‌ها، بسته به تعداد واکنش، حجم کل مخلوط، بیشتر از حجم کل واکنش‌های مورد نیاز تهیه می‌شود. بهتر است تهیه مخلوط واکنش PCR روی یخ انجام شود. در مرحله بعد، به کمک میکروپیپت، 24 میکرولیتر از مخلوط فوق به هریک از لوله‌های 0/2 میلی‌لیتری ویژه PCR، منتقل می‌شود. سپس یک میکرولیتر از DNA ژنومی هر نمونه به کمک میکروپیپت‌های ده میکرولیتری به مخلوط درون هر تیوب PCR اضافه می‌شود. لوله‌های PCR درون چاهک‌های دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و سپس برنامه حرارتی برای واکنش‌های PCR و تکثیر قطعات DNA تنظیم می‌شود (جدول 2).

جدول 2- برنامه زمانی ارائه‌شده به دستگاه ترموسایکلر جهت انجام واکنش PCR.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه[1]	94	5	1
واسرشته‌سازی[2]	94	1	30
اتصال[3]	50	1	
گسترش[4]	72	1	
گسترش نهایی[5]	72	10	1

[1] Initial denaturation
[2] Denaturation
[3] Annealing
[4] Extension
[5] Primer extension

پس از پایان زمان انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر محصول PCR را مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز نمایید.

2-1-1-4- الکتروفورز ژل آگارز[1]

از روش‌های آزمایشگاهی مرسوم برای جداکردن مولکول‌های باردار مانند DNA، RNA و پروتئین تکنیک الکتروفورز ژل آگارز است. این جداسازی با توجه به اندازه، بار و جرم مولکولی آنها انجام می‌شود. ژلی که برای این روش استفاده می‌شود از پودر آگارز و یا پلی آکریلامید است. ساختار این ژل‌ها منفذدار است و همین امر موجب می‌شود تا مولکول‌ها با اندازه‌های متفاوت به‌راحتی از آن عبور کنند. برای کوچک یا بزرگ کردن این منافذ برای حرکت مولکول‌های کوچکتر و یا بزرگتر، می‌توانیم غلظت ژل‌های استفاده شده در الکتروفورز را کمتر و یا بیشتر کنیم. فرآیند کلی این تکنیک به این صورت است که با برقراری جریان در ژل الکتروفورز، دو سمت ژل دارای دو قطب مخالف مثبت و منفی می‌شود که باعث می‌شود مولکول‌های باردار به سمت قطب مخالف خود حرکت کنند. این عمل حرکت مولکول‌ها با اصطلاح "مهاجرت" شناخته شده است. دلیل این مهاجرت ساختار ماتریکس نفوذپذیر ژل است که مولکول‌ها می‌توانند از میان منافذ موجود در آن عبور و در طول ژل حرکت کنند.

وسایل و تجهیزات

- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- سینی[2] و شانه ویژه ژل آگارز
- تانک الکتروفورز افقی
- دستگاه ترانس لومیناتور
- بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری

[1] Agarose gel electrophoresis
[2] Tray

- بشر 50 میلی‌لیتری
- رنگ بارگذاری نمونه[1]

مواد و واکنش‌گرها

- پودر آگارز
- بافر TBE (0/5 X): برای شروع یک محلول غلیظ از بافر TBE (5 X) تهیه نمایید. مقدار 54 گرم Tris HCL و 27/5 گرم بوریک اسید را در 900 میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. سپس 20 میلی‌لیتر EDTA نیم مولار با PH=8 را به آن‌ها اضافه نموده و پس از بهم زدن به حجم یک لیتر برسانید. محلول حاصل را اتوکلاو و در دمای اتاق نگهداری نمایید. از این محلول غلیظ بافر TBE غلظت 0/5 X تهیه شود. EDTA به سختی در آب حل می‌شود از این‌رو برای تهیه 20 میلی‌لیتر EDTA نیم مولار مقدار 3/722 گرم EDTA را در 8 میلی‌لیتر آب مقطر در یک بشر 50 میلی‌لیتری ریخته و قطره قطره NaOH غلیظ به آن اضافه شود تا درپایان با یک کدورت نسبی کم PH آن بر روی 8 تنظیم شود. پس از تنظیم PH حجم آن را به 20 میلی‌لیتر برسانید.
- نشانگر DNA [2]
- رنگ DNA [3] برای ژل
- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن ITS1-5.8S- ITS2

روش کار

برای انجام الکتروفورز ژل آگارز که مراحل آن در شکل 3 نشان داده شده است به ترتیب زیر عمل می‌شود.

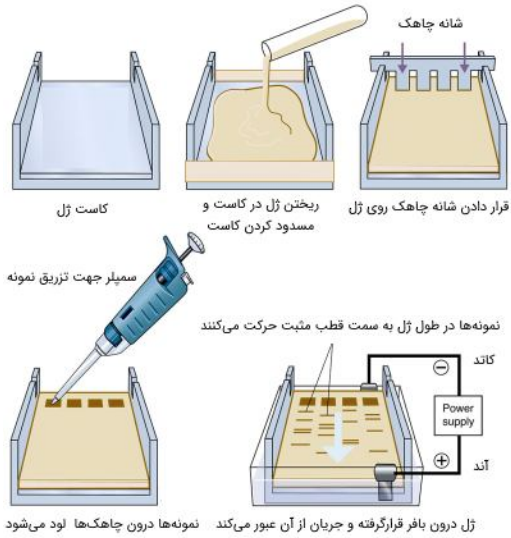
- تهیه ژل آگارز 1/2 درصد: 1/2 گرم از پودر آگارز را در 100 میلی‌لیتر بافر TBE (0/5 X) مخلوط کرده و به کمک حرارت حل شود تا سرانجام محلول شفافی بدست آید. حدود

[1] Loading dye
[2] Ladder
[3] DNA stain

10 الی 20 دقیقه صبر کنید تا دمای ژل کاهش یافته و به حدود 60 درجه سانتی‌گراد برسد. 2 میکرولیتر رنگ DNA به آن اضافه نموده و به آرامی بهم بزنید.

- دو طرف سینی را با نوار چسب مسدود کرده و ژل را درون آن بریزید. سپس شانه ویژه چاهک را روی ژل قرار دهید. پس از سفت و محکم شدن ژل در دمای آزمایشگاه شانه را خارج نموده و از چاهک‌های برجای مانده به‌عنوان محل قرار دادن نمونه استفاده کنید.

- نوار چسب سینی دارای ژل را برداشته و آن را در درون تانک الکتروفورز افقی دارای مقدار کافی بافر TBE (0/5 X) قرار دهید.



شکل 3- مراحل مختلف انجام الکتروفورز ژل آگارز.

- مقدار مشخصی محصول PCR (6 میلی‌لیتر) را با رنگ بارگذاری نمونه (2 میلی‌لیتر) (نسبت 3 به 1) مخلوط نماید.

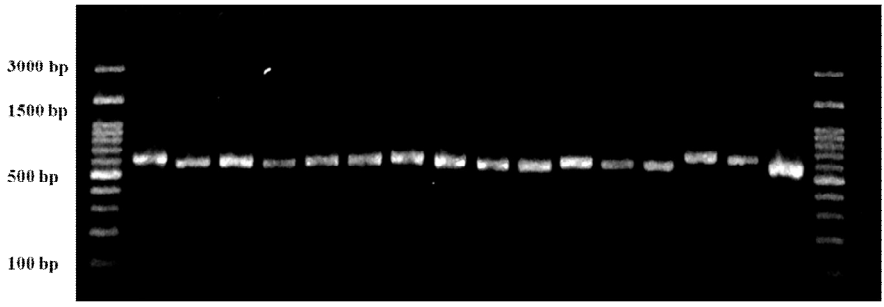
- مخلوط حاصل را با استفاده از سمپلر در درون چاهک ژل بریزید.

- مقدار معینی از نشانگر DNA (به اندازه مقدار محصول PCR) را در دو چاهک کناری دو طرف ژل بریزید.

- دستگاه ترانس لومیناتور را روشن کرده، ولتاژ آن را بر روی 100 ولت تنظیم و به مدت 1/5 ساعت الکتروفورز نمایید.

- ژل تحت نور UV نمایان و با استفاده از دستگاه ژل داک (شکل 4) تصویر آن ثبت شود. مقایسه باند تکثیرشده با نشانگر DNA ، تکثیر بخش موردنظر ژنوم به اندازه حدود 600 جفت باز (bp)[1] را نشان می‌دهد (شکل 5).

شکل 4- دستگاه ژل‌داک استفاده شده برای ثبت تصویر ژل تحت نور UV.

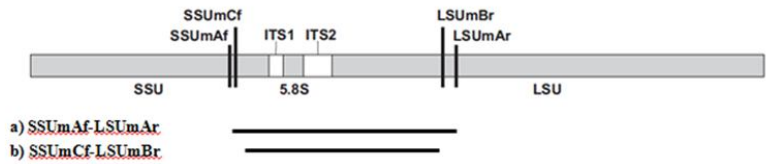


شکل 5- تکثیر باند 600 جفت بازی ناحیه ژنی ITS1-5.8S- ITS2 از rDNA هسته‌ای جدایه‌های متعلق به قارچ‌های اندوفیت به کمک آغازگر ITS1 و ITS4 در ژل آگارز یک درصد (دولت آباد و همکاران، 1395).

[1] Base pair

2-1-2- شناسایی مولکولی قارچ های میکوریز

در تعدادی از قارچ‌ها از جمله قارچ‌های میکوریز از نواحی 18S rDNA، 28S rDNA و ITS به طور همزمان استفاده می‌شود (شکل 6).



شکل 6- تکثیر نواحی rDNA برای شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی میکوریز آربوسکلار. a, b) تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای. خطوط تیره نشان‌دهنده نواحی تکثیر شده است (کروگر و همکاران، 2009).

2-1-2-1- استخراج DNA ژنومی قارچ های میکوریز

برای بدست آوردن DNA ژنومی در قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، ضدعفونی اسپورها با قرار دادن اسپورها در محلول کلرآمین T دو درصد به‌مدت 10 دقیقه، شستشوی اسپور با آب مقطر استریل، قرار دادن اسپورها در محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت پنج دقیقه، شستشوی اسپورها با آب مقطر استریل، قرار دادن اسپورها در محلول 0/02 درصد استرپتومایسین به‌مدت پنج دقیقه و سپس شستشو با آب مقطر استریل انجام می‌شود (سرینیواسان و همکاران، 2014). در پایان یک اسپور توسط استریومیکروسکوپ با حداقل میزان آب مقطر استریل روی اسلاید قرار می‌گیرد. پس از خشک شدن آب، اسپور با نوک سوزن شکسته می‌شود. سپس با 10 میکرولیتر آب سترون تمامی محتویات اسپور به میکروتیوپ سترون منتقل می‌شود (بلاشکوفسکی و همکاران، 2017).

2-1-2-2- تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای

برای تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU واکنش زنجیره پلیمراز به روش آشیانه-ای با استفاده از آغازگرهای جدول 3 با تغییراتی انجام می‌شود (کروگر و همکاران، 2009).

جدول3- توالی آغازگرهای مورد نیاز برای تکثیر ژنومی ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU قارچ‌های میکوریز.

آغازگر	توالی
SSUmAf1	5’-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3’
SSUmAf2	5’-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3’
SSUmCf1	5’-TCGCTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf2	5’-TATTGTTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf3	5’-TATTGCTCTTNAACGAGGAATC-3’
LSUmAr1	5’-GCTCACACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr2	5’-GCTCTAACTCAATTCTATCGAT-3’
LSUmAr3	5’-TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr4	5’-GCTCTTACTCAAACCTATCGA-3’
LSUmBr1	5’-DAACACTCGCATATATGTTAGA-3’
LSUmBr2	5’-AACACTCGCACACATGTTAGA-3’
LSUmBr3	5’-AACACTCGCATACATGTTAG-3’
LSUmBr4	5’-AAACACTCGCACATATGTTAGA-3’
LSUmBr5	5’-AACACTCGCATATATGCTAGA-3’

مواد مرحله اول پی‌سی‌ار برای یک نمونه با حجم 25 میکرولیتر تهیه می‌شود که شامل 2/5 میکرولیتر بافر پی‌سی‌ار، 0/5 میکرولیتر dNTP (10 میلی‌مولار)، 0/5 میکرولیتر کلرید منیزیم (50 میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آغازگرهای SSUmAf و LSUmAr (10پیکومول در میکرولیتر) و 0/2 میکرولیتر آنزیم Taq دی.ان.ای پلیمراز (5 واحد در میکرولیتر) است. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشته‌سازی اولیه چهار دقیقه در 94 درجه سلسیوس، 35 چرخه شامل واسرشته‌سازی در 94 درجه سلسیوس یک دقیقه، اتصال آغازگر در 50 درجه سلسیوس یک دقیقه، بسط در 72 درجه سلسیوس 90 ثانیه و بسط نهایی در 72 درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه صورت می‌پذیرد که در این مرحله قطعه‌ای به طول 1800 جفت باز تکثیر می‌شود. محصول پی‌سی‌ار اول در مرحله دوم واکنش استفاده می‌شود که در حجم کل 25 میکرولیتر با آغازگرهای SSUmCf و LSUmBr مطابق با شرایط پی‌سی‌ار اول صورت می‌پذیرد. در پی‌سی‌ار مرحله دوم دمای اتصال آغازگر 53 درجه سلسیوس است که در این مرحله قطعه‌ای به طول 1500 جفت باز تکثیر می‌شود.

2-2- شناسایی مولکولی باکتری

در جدایه‌های باکتری برای شناسایی اولیه در سطح گونه از ناحیه 16S rDNA استفاده می‌شود (شکل 7).

شکل 7- تکثیر ناحیه 16S rDNA جهت شناسایی جدایه‌های باکتری. خط تیره نشان دهنده ناحیه تکثیر شده است (تناک، 1999).

2-2-1- استخراج DNA ژنومی باکتری

شرکت‌های مختلفی در داخل و خارج از کشور اقدام به تولید کیت استخراج DNA برای باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نموده‌اند. این کیت‌ها دارای مواد و مراحلی مختلفی هستند که به منظور استخراج DNA با کیفیت بالا می‌بایست به طور دقیق استفاده شوند.

2-2-2- تکثیر ناحیه ژنومی 16S rDNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R با توالی‌های ارائه شده در جدول 4 استفاده می‌شود (جیانگ و همکاران، 2006).

جدول 4- توالی آغازگرهای عمومی 27F و 1492R.

آغازگر	توالی
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5′-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3′

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر

- رک و سرسمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگرهای عمومی 27F و 1492R (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 25 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 5). برای انجام اینکار تمام مواد به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و با استفاده از سمپلر در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری ریخته و بخوبی بهم بزنید.

جدول 5- مقادیر مواد برای یک نمونه در 25 میکرولیتر مخلوط واکنش تکثیر ژن 16S rDNA.

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگر 27F	آغازگر 1492R	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	19/9	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/25	0/4

- 24/6 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 0/4 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و مطابق جدول 6 تنظیم نمایید:

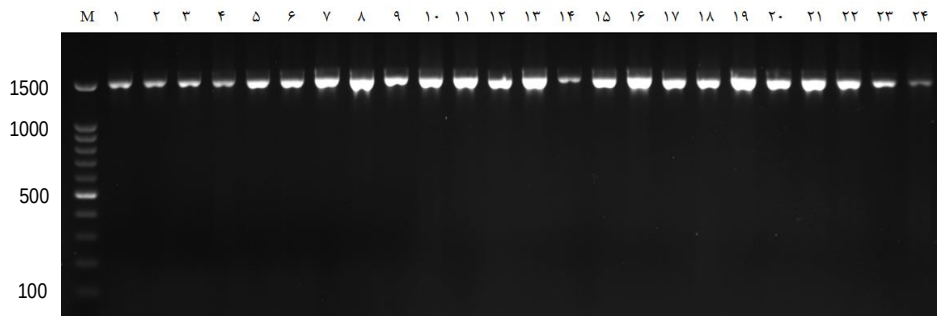
جدول 6- شرایط انجام PCR برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	94	5	1
واسرشته‌سازی	94	1	30
اتصال	55	1	
گسترش	72	1	
گسترش نهایی	72	7	1

- نمونه ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- پس از پایان زمان انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر محصول PCR را همانند بخش 2-1-1-4- الکتروفورز نمایید.

مقایسه باند تکثیرشده با نشانگر DNA، تکثیر بخش موردنظر ژنوم به اندازه حدود 1500 جفت باز (bp) را نشان می‌دهد (شکل 8).



شکل 8- تکثیر باند 1500 جفت باز ناحیه ژنی 16S rRNA باکتری‌ها. شماره‌های 24-1 نشان دهنده جدایه‌های مختلف هستند. M نشانگر DNA با اندازه 100 تا 1500 جفت باز است (جهاندیده و همکاران، 1399).

3-2- تجزیه و تحلیل نتایج شناسایی مولکولی

به‌منظور تعیین توالی، قطعات حاصل از تکثیر نواحی ژنومی جدایه‌های قارچی و باکتری به شرکت‌های توالی‌یابی ارسال می‌شوند. پس از دریافت نتایج، توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح و یک توالی همپوشان برای هر ژن یک جدایه به‌دست می‌آید. توالی‌های همپوشان در پایگاه NCBI و یا بانک‌های مرتبط با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه می‌شوند. پس از تعیین نام گونه، توالی ژن‌های مرتبط در GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) ثبت و شماره دسترسی[1] برای هر یک از آن‌ها به‌دست می‌آید.

3- بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها و باکتری‌ها

پیدایش روش‌های ژنتیک مولکولی و کاربرد آن‌ها در اکولوژی میکروبی نشان داده است که تنها بخش کوچکی از تنوع میکروبی طبیعی کشف شده است. اطلاعات دقیق در باره ژنتیک مولکولی ریزجاندارن شناسایی نشده ممکن است اطلاعات بیشتری در تکامل عملکرد ریزجانداران از یک گونه معین در زیستگاه خود و یا در یک محیط خارجی ارائه نماید. مطالعات مولکولی از جمله شناسایی از طریق ژن‌های rRNA می‌توانند در شناسایی مفید واقع شوند ولی این روش نیز وقت‌گیر است و نیاز به داشتن اطلاعات کافی درباره توالی ژن-های rRNA دارد. برای گونه‌های بسیار نزدیک نیز تجزیه و تحلیل توالی ژن‌های rRNA به اندازه کافی اختصاصی نیست. بنابراین روش‌هایی که بتوانند از مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده نمایند، اما نیازمند اطلاعات اولیه در مورد توالی DNA مورد نظر نباشند ضروری هستند.

در زیر برخی از این روش‌ها که اطلاعات مناسبی از تنوع میکروبی را ارائه می‌دهند توضیح داده شده‌اند.

[1] Accession number

3-1- روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس عناصر پالیندرومی خارج ژنی تکراری (rep-PCR)[1]

روش‌های انگشت‌نگاری ژنومی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای شناسایی و طبقه‌بندی ریزجانداران به سطح زیر گونه استفاده می‌شود. در میان انواع مختلف روش‌های ژنتیکی موجود، آزمون rep-PCR یک ابزار متمایزکننده قوی برای اهداف تاکسونومی فراهم می‌کند و می‌تواند برای تعیین تنوع و تکامل بین ژنوم‌های مختلف میکروبی استفاده شود. این روش برای تفکیک و طبقه‌بندی سویه‌های میکروبی در سطح زیر گونه مفید است. یک مجموعه عناصر تکراری در ژنوم تمام ریزجانداران وجود دارند که یکی از مهمترین مشخصات آن‌ها است. تعدادی از قطعات این عناصر تکراری در ژنوم باکتری‌ها و قارچ‌ها پیدا شده است. اگرچه عملکرد دقیق این عناصر تکراری در ژنوم مشخص نیست. سه خانواده از این عناصر تکراری شامل REP[2] یا PU[3] با 35 تا 40 جفت باز، ERIC[4] یا IRU[5] با 124 تا127 جفت باز و BOX با 154 جفت باز مطالعه شده‌اند. بر اساس این عناصر روشی طراحی شده است که ژنوم مابین این دو عناصر را تکثیر می‌کند؛ یعنی آغازگرهایی مطابق با این عناصر تکراری ساخته و سپس با استفاده از PCR این قسمت تکثیر می‌شود و می‌توان تفاوت را بین جدایه‌های مختلف بر اساس این اطلاعات تعیین نمود. نام این روش‌ها REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR بوده که در زیر جزئیات مراحل انجام هرکدام توضیح داده شده است.

3-1-1- آزمون BOX-PCR

برای انجام آزمایش BOX-PCR از آغازگر BOXAIR ('5-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') استفاده می‌شود (ورسالوویچ و همکاران، 1994).

[1] Repetitive element sequence-based PCR
[2] Repetitive extragenic palindromic
[3] Palindromic unit
[4] Enterobacterial repetitive intergenic
[5] Intergenic repeat unit

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سرسمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگر BOXAIR (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سر سمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 30 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 7). برای انجام اینکار تمام مواد به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 7- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش BOX.

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگر BOXAIR	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	21/28	3	1/8	0/24	1/2	0/48	2

- 28 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 2 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

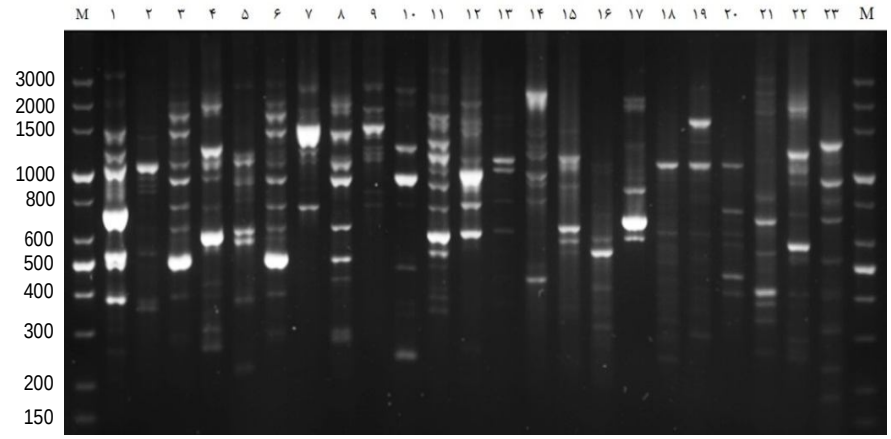
- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و مطابق جدول 8 تنظیم نمایید:

جدول 8- شرایط انجام PCR برای آزمایش BOX.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	95	6	1
واسرشته‌سازی	94	1	30
اتصال	50	1	
گسترش	72	4	
گسترش نهایی	72	7	1

- نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- محصول PCR مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 9). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



شکل 9- الگوهای باندی به‌دست آمده از BOX-PCR جدایه‌های مختلف باکتری، شماره‌های 1-23 نشان‌دهنده جدایه‌های مختلف باکتری هستند. M نشانگر DNA با اندازه 150 تا 3000 جفت باز است (جهاندیده و همکاران، 1399).

3-1-2- آزمون REP-PCR

برای انجام آزمایش REP-PCR از آغازگرهای REP1R و REP2I با توالی‌های ارائه شده در جدول 9 استفاده می‌شود (ورسالوویچ و همکاران، 1991).

جدول 9- توالی آغازگرهای REP1R و REP2I.

آغازگر	توالی
REP1R	5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3'
REP2I	5′-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3′

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سرسمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر

- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگرهای REP1R و REP2I (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 30 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 10). برای انجام اینکار تمام مواد زیر به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 10- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش REP-PCR.

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگر REP2I	آغازگر REP1R	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	19/48	3	1/8	1/8	0/24	1/2	0/48	2

-28 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 2 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

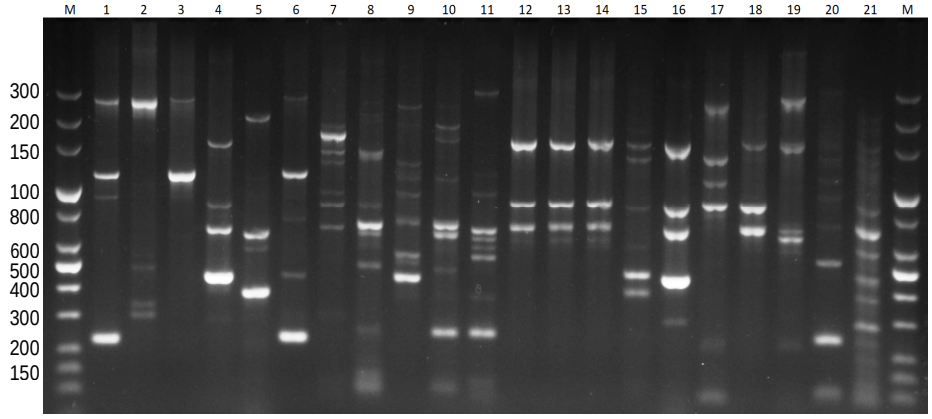
- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و همانند جدول 11 تنظیم نمایید:

جدول 11- شرایط انجام PCR برای آزمایش REP-PCR.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	95	6	1
واسرشته‌سازی	94	1	35
اتصال	40	1	
گسترش	72	4	
گسترش نهایی	72	7	1

- نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- محصول PCR مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 10). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



شکل 10- الگوهای باندی به‌دست آمده از REP-PCR جدایه‌های مختلف باکتری. شماره‌های 21-1 نشان‌دهنده جدایه‌های مختلف باکتری هستند. M نشانگر DNA با اندازه 150 تا 3000 جفت باز است (دولت آباد و همکاران، 1401).

3-1-3- آزمون ERIC-PCR

برای انجام آزمایش ERIC-PCR از آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 با توالی‌های ارائه شده در جدول 12 استفاده می‌شود (ورسالوویچ و همکاران، 1991).

جدول 12- توالی آغازگرهای ERIC1R و ERIC2.

آغازگر	توالی
ERIC1R	5'- ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC -3'
ERIC2	5′- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG -3′

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase (5 U μl^{-1})

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 30 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 13). برای انجام اینکار تمام مواد زیر به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 13- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش ERIC-PCR.

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگرهای ERIC1R	آغازگرهای ERIC2	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	19/48	3	1/8	1/8	0/24	1/2	0/48	2

- 28 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 2 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

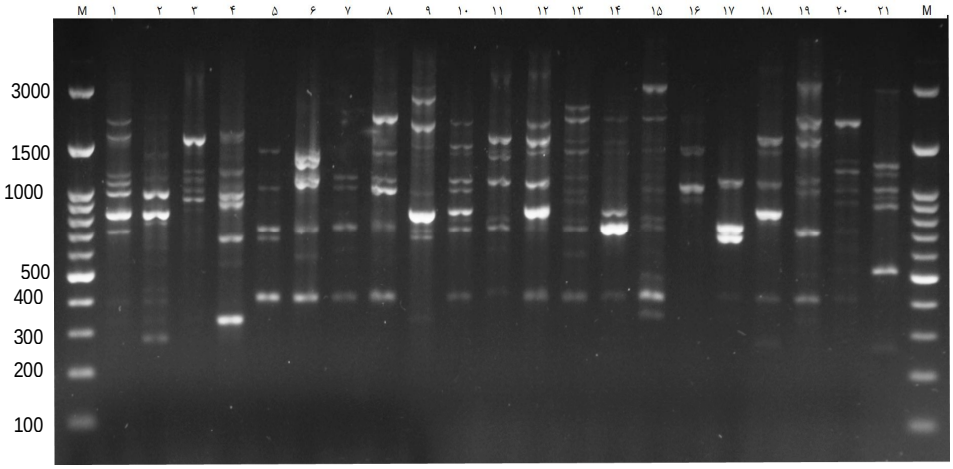
- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و مطابق جدول 14 تنظیم نمایید:

جدول 14- شرایط انجام PCR برای آزمایش ERIC-PCR.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	95	6	1
واسرشته‌سازی	94	1	35
اتصال	53	1	
گسترش	72	4	
گسترش نهایی	72	7	1

- نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- محصول PCR مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 11). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



شکل 11- الگوهای باندی به‌دست آمده از ERIC-PCR جدایه‌های مختلف باکتری. شماره‌های 21-1 نشان‌دهنده جدایه‌های مختلف باکتری هستند. M نشانگر DNA با اندازه 150 تا 3000 جفت باز است (جهاندیده و همکاران، 1399).

2-3- روش DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD)[1]

نشانگر RAPD یکی از نشانگرهای مبتنی بر PCR می‌باشد، که برای انجام آن نیازمند اطلاعات اولیه در مورد ردیف بازی DNA نمی‌باشد. در این روش برخلاف روش‌های استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از آغازگرهایی با طول 8 تا 10 نوکلئوتیدی که ردیف آنها به طور قراردادی تعیین می‌شود، استفاده می‌شود (نقوی و همکاران، 1384). از این نشانگر در تهیه نقشه‌های ژنتیکی، نشان‌دار کردن جدایه‌ها، شناسایی آن‌ها و ارزیابی تنوع

[1] Random amplified polymorphic DNA

ژنتیکی در جمعیت‌ها و گونه‌ها و همچنین مطالعه روابط تبارزایی بین گونه‌ها، زیرگونه‌ها، پاتوتیپ‌ها و نژادها استفاده می‌شود (تومراپ و همکاران، 1995). از جمله مزایای RAPD می‌توان به شمار زیاد قطعات، ساده بودن آن، آسانی در تهیه آغازگرها و نیاز نداشتن به اطلاعات ژنتیکی و ژنومی، نیاز به مقدار کم DNA و هزینه کم اشاره کرد. از نواقص این روش می‌توان به تکرار ناپذیری و غالب بودن آن اشاره کرد. برای نمونه در قارچ‌ها هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را نمی‌توان از یکدیگر تشخیص داد.

در بین روش‌های مولکولی روش RAPD روش قابل اعتمادی است که با درستی بسیار زیاد و به شکل موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ریزجانداران استفاده می‌شود. در این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته DNA ژنومی پیدا کرده و در آن نقاط به رشته‌های DNA متصل می‌شود. چنانچه محل پیوند آغازگرها بر روی دو رشته متقابل به هم نزدیک باشند (فاصله‌ای که DNA قابل تکثیر است)، ردیف بین آن دو نقطه در فرایند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر خواهد شد. چندشکلی مشاهده شده در تکنیک RAPD به دلیل تفاوت در محل پیوند آغازگرها (جهش‌های نقطه‌ای) و یا بازآرایی در داخل قطعات تکثیر یافته (حذف، واژگونی و اضافه) است.

برای انجام آزمایش RAPD می‌توان از آغازگر RP04 (5'-GGAAGTCGCC-3') استفاده کرد (ریچاردسون و همکاران، 1995).

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگر RAPD (RP04) (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 30 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 15). برای انجام اینکار تمام مواد زیر به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 15- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش RAPD.

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگر RP04	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	19/58	3	1/5	0/24	1/2	0/48	4

- 26 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 4 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

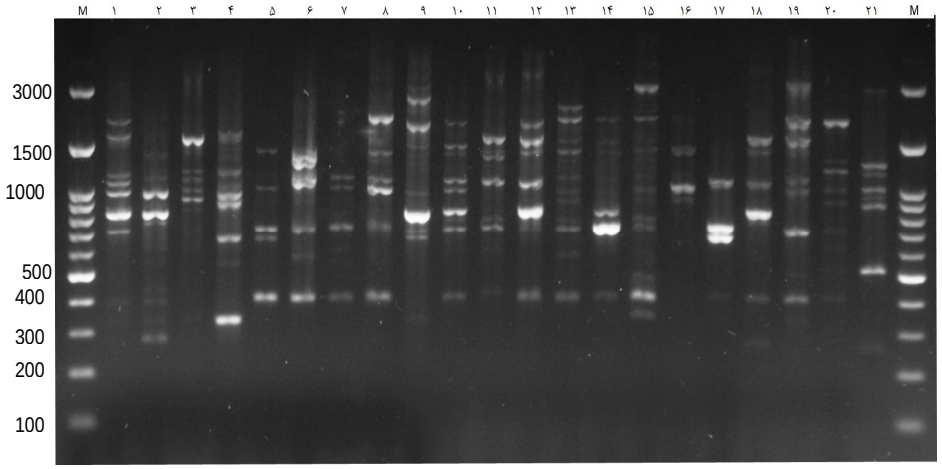
- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و مطابق جدول 16 تنظیم نمایید:

جدول 16- شرایط انجام PCR برای آزمایش RAPD.

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	95	6	1
واسرشته‌سازی	94	1	35
اتصال	40	2	
گسترش	72	4	
گسترش نهایی	72	7	1

- نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- محصول PCR مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 12). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



شکل 12- الگوهای باندی به‌دست آمده از آزمون RAPD جدایه‌های مختلف باکتری. شماره‌های 1-21 نشان‌دهنده جدایه‌های مختلف باکتری هستند. M نشانگر DNA با اندازه 100 تا 3000 جفت باز است (دولت آباد و همکاران، 1401).

3-3- روش چند شکلی طول قطعات حاصل از برش (RFLP)[1]

این روش تنوع در اندازه قطعات حاصل از برش (هضم) با آنزیم‌های محدودکننده شامل Alu I، Hpa II، BshF I، Hinf I، Rsa I و .... را نشان می‌دهد. آنزیم‌های محدودکننده DNA، توالی خاصی را در سطح DNA مور نظر شناسایی و برش می‌دهند و از این‌رو براساس وجود جهش در جایگاه‌های تشخیص و یا از بین رفتن جایگاه‌های شناسایی آنزیم قطعات متفاوتی بوجود می‌آید. مکان‌های تشخیص این آنزیم‌ها معمولاً 4 تا 6 جفت باز طول دارند. هرچه توالی شناسایی شده کوتاهتر باشد، تعداد قطعات تولید شده از هضم بیشتر است؛ برای نمونه اگر یک توالی کوتاه از GAGC داشته باشیم که به شکل پیاپی در یک نمونه از DNA وجود دارد، آنزیم محدودکننده که توالی GAGC را تشخیص می‌دهد، DNA را در هر تکرار الگوی GAGC برش خواهد داد. در نتیجه جهش‌های نقطه‌ای و یا باز آرایی (مانند حذف و اضافه) که سبب تفاوت در تعداد محل‌های برش آنزیمی و یا تغییر در اندازه قطعات می‌شود منجر به مشاهده پلی‌مورفیسم در ساختار DNA می‌شود.

درباره باکتری‌ها در مقالات مختلفی ناحیه ژنی 16S rDNA توسط این آنزیم‌های محدودکننده برش داده شده و قطعات بدست آمده برای بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌ها بررسی شده قرار گرفته شده‌اند. هرچند بسته به جنس و یا گونه‌ی باکتری‌های مورد نظر ژن‌های دیگر نیز استفاده می‌شوند. در زیر هضم آنزیمی ژن 16S rDNA با جزئیات آورده شده است (موير و همکاران، 1994).

وسایل و تجهیزات

- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر
- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- انکوباتور (گرم‌خانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism

- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول 16S rRNA حاصل از PCR
- آنزیم محدودکننده (Alu I، Hpa II، BshF I، Hinf I، Rsa I و ....) ($10\ U\ \mu l^{-1}$)
- بافر پی سی آر (10X)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 20 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند. برای انجام اینکار تمام مواد زیر (جدول 17) به جز محصول 16S rDNA حاصل از PCR را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 17- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش RFLP.

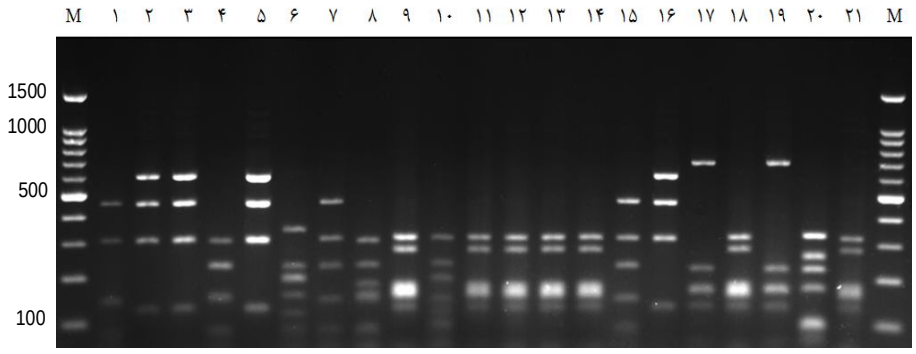
ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آنزیم	محصول 16S rDNA
مقدار (میکرولیتر)	7/5	2	0/5	10

- 10 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 10 میکرولیتر محصول 16S rDNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

- مخلوط به مدت یک شبانه روز در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

- به منظور جلوگیری از انجام واکنش مخلوط در یک بن‌ماری به مدت 30 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار داده شود.

- سپس، چندشکلی حاصل از برش ناحیه ژنی 16S rDNA با آنزیم محدودکننده و طول قطعات برش خورده مطابق بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 13). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



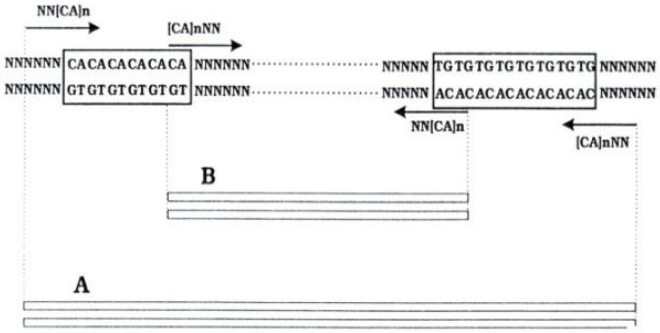
شکل 13 - الگوهای باندی بدست آمده از آزمون RFLP به وسیله هضم ژن 16S rDNA جدایه‌ها با آنزیم Bshf I. شماره‌های 21-1 نشان‌دهنده جدایه‌های مختلف باکتری هستند. M نشانگر DNA با اندازه 100 تا 1500 جفت باز است (جهاندیده و همکاران، 1399).

3-4- روش چندشکلی نواحی تکرای ساده میانی (ISSR)[1]

توالی‌های ساده تکراری یا ریزماهواره‌ها[2] توالی‌های DNA هستند که شامل 2-5 نوکلئوتید واحد مانند (CA)، (CTT) و (ATGT) هستند که هر کدام پی‌درپی تکرار می‌شوند. این توالی‌های تکراری DNA در سراسر ژنوم پراکنده هستند. مناطق کناری ریزماهواره‌ها معمولاً در ژنوتیپ‌های همان گونه حفاظت شده‌اند. آغازگرهای PCR در مناطق کناری برای تکثیر قطعات DNA دارای SSR استفاده می‌شوند. یک آغازگر با توالی SSR و تا حدودی با بازهای اختیاری ساخته می‌شود. دو نوع آغازگر مطابق با نسبت موقعیت‌های

[1] Inter Simple Sequence Repeat
[2] Microsatellite

این دو بخش قابل تصور است (شکل 14). همزمان چندین قطعه نزدیک با SSRs تکثیر می‌یابند (وین و همکاران، 2003).



شکل 14- اصول توالی‌های تکراری ISSR. اگر بازهای اختیاری آغازگر در انتهای `5 هستند محصول تکثیری A بدست می‌آید. اگر آن‌ها درانتهای `3 باشد محصولات B بدست می‌آیند (وین و همکاران، 2003).

ریزماهواره‌ها دارای چندشکلی بالایی نسبت به سایر نشانگرهای ژنتیکی هستند. از برتری‌های دیگر می‌توان به توارث آن‌ها به صورت هم‌بارزی اشاره نمود. برای انجام آزمایش ISSR می‌توان از آغازگرهای ارائه شده در جدول 18 استفاده شود (محمدی و همکاران، 1394).

جدول 18- توالی آغازگرهای ISSR.

آغازگر	دمای اتصال	توالی
$(GTG)_5$	64	5'- GTGGTGGTGGTGG -3'
$(GAC)_5$	60	5'- GACGACGACGACGAC -3'
$(CAG)_5$	58	5'- CAGCAGCAGCAGCAG -3'
PCMS	56	5'- GTCGTCGTCGTCGTCGTCGT -3'
ISSR10	54	5'- CACCACCACCACCAC -3'
ISSR02	52	5'- ACTGACTGACTGACTG -3'

وسایل و تجهیزات

- ترموسایکلر
- سمپلر به حجم 1000-10 میکرولیتر

- رک و سر سمپلر استریل به حجم 1000-10 میکرولیتر
- اتوکلاو
- میکروتیوب 200 و 1500 میکرولیتر
- هود لامینار
- آب دیونیزه

مواد و واکنش‌گرها

- محصول DNA
- آغازگر ISSR (10 pmol)
- بافر پی سی آر (10X)
- dNTPs (2 mM)
- $MgCl_2$ (50 mM)
- آنزیم Taq DNA polymerase ($5\ U\ \mu l^{-1}$)

روش کار

- میکروتیوب‌ها و سرسمپلرها (در داخل رک ویژه خود قرار داده شوند) را با استفاده از اتوکلاو استریل نمایید.

- 30 میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر است که می‌بایست برای تعداد نمونه‌های مورد نظر محاسبه و بصورت یکجا در زیر هود لامینار ساخته شوند (جدول 19). برای انجام اینکار تمام مواد زیر به جز DNA را برای نمونه‌های مورد نظر حساب نموده و در یک میکروتیوب 1500 میکرولیتری بریزید و بخوبی بهم بزنید.

جدول 19- مقادیر مواد برای یک نمونه در 30 میکرولیتر مخلوط واکنش آزمایش ISSR .

ماده	آب دیونیزه	بافر PCR	آغازگر ISSR	dNTPs	$MgCl_2$	Taq DNA polymerase	DNA
مقدار (میکرولیتر)	19/58	3	1/5	0/24	1/2	0/48	4

- 26 میکرولیتر از محلول واکنش را داخل میکروتیوب‌های 200 میکرولیتر ریخته و به هرکدام 4 میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر اضافه نمایید.

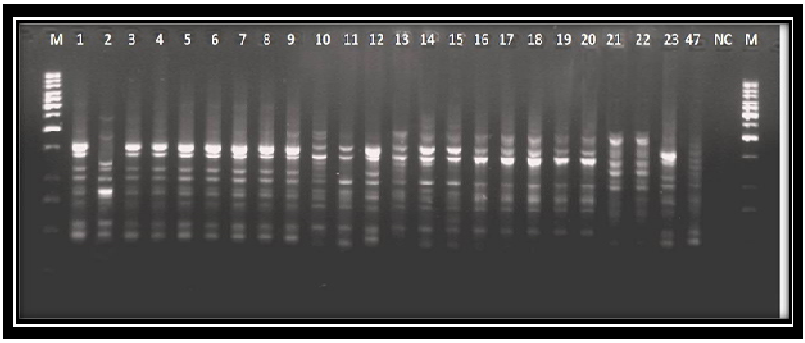
- دستگاه ترموسایکر را روشن نموده و مطابق جدول 20 تنظیم نمایید:

جدول 20- شرایط انجام PCR برای آزمایش ISSR .

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	95	5	1
واسرشته‌سازی	94	20 ثانیه	40
اتصال	64-52	1	
گسترش	72	20 ثانیه	
گسترش نهایی	72	6	1

- نمونه‌ها را در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و گزینه START را بزنید.

- محصول PCR همانند بخش 2-1-1-4- الکتروفورز شده و تصویر ژل با دستگاه ژل‌داک ثبت شود (شکل 15). باید دقت شود که در این مرحله ژل آگارز 2 درصد (v/v) و ولتاژ 100 ولت به مدت 2 ساعت است.



شکل 15- الگوی باندی حاصل از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR در جدایه‌های مختلف قارچی M: نشانگر اندازه 1kb DNA (محمدی و همکاران، 1394).

نکات

-آغازگرهای موجود بیشتر به صورت خشک و غیر مایع است. نخست میکروتیوب دارای آغازگر را در دور 3000-5000 rpm به‌مدت 30 ثانیه سانتریفیوژ نمایید. سپس در زیر هود لامینار مقدار تعیین شده (بر روی برچسب موجود است) آب دیونیزه را به میکروتیوب اضافه نموده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شود. آغازگر حاصل 100 pmol است که می‌بایست غلظت 10 pmol از آن تهیه شود.

- در صورت ممکن نبودن انجام فوری الکتروفورز، نمونه‌ها را در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

- همه مراحل از زمان تهیه مخلوط واکنش تا قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر بر روی یخ انجام شود.

- باید توجه داشت که نمی‌توان جواب گرفتن را برای همه نمونه‌ها و هر نوع دستگاه PCR تضمین کرد. ازاین‌رو نخست می‌بایست واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در آزمایشگاه بهینه شود. بهینه کردن اجزای PCR و شرایط دستگاه PCR به اندازه و کیفیت DNA الگو بستگی دارد. پیشنهاد می‌شود در صورت جواب نگرفتن با شرایط اشاره شده مقادیر مختلف اجزای PCR و شرایط دستگاه PCR (به ویژه دمای اتصال) بررسی شده تا شرایط بهینه بدست آید.

3-5- تجزیه و تحلیل نتایج تنوع ژنتیکی

نخست با استفاده از نرم‌افزار Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system (NTsys-PC version 2.02) فاصله‌ی ژنتیکی جدایه‌ها بر اساس الگوهای باندی تشکیل شده ترسیم می‌شود. تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی[1] انجام و برای بررسی فاصله‌ی واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted pair- using Group Method Arithmetic Average (UPGMA) و ضریب تشابه جاکارد (J) استفاده می‌شود. نتایج

[1] - Hierarchical technique

حاصل از الگوهای باندی به صورت کدهای صفر (وجود نداشتن باند) و یک (وجود باند) با استفاده از نرم افزار تعریف می‌شوند. این نرم افزار توانایی تحلیل داده‌ها و رسم دندروگرام را دارا است. سرانجام دندروگرام تنوع ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم می‌شود.

فهرست منابع

جهاندیده، و.م.، سپهری، م.، اسدی رحمانی، ه.، زارعی، م.، رونقی، ع. و تقوی، م. 1399. شناسایی و مطالعه تنع ژنتیکی باکتری‌های فیلوسفری ذرت و بررسی تأثیر برگ‌پاشی باکتری‌ها بر رشد و عملکرد ذرت. دانشگاه شیراز. 140ص.

دولت آباد، ح.ک. 1401. شناسایی چندژنی و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های برتر ریزوبیوم همزیست عدس. موسسه تحقیقات خاک و آب. 55 ص.

دولت‌آباد، ح.ک.، جوان‌نیکخواه، م.، احمدزاده، م. و فتوحی‌فر، خ .1395. بررسی فعالیت ضد قارچی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از برخی گیاهان؛ بهبود کارآیی استرین منتخب به روش امتزاج پروتوپلاست‌ها. دانشگاه تهران. 270 ص.

محمدی، ن.، محمدی گل تپه، ا.، بابای اهری، ا. و پورعلی بابا، ح.1394. مطالعه بیماری‌زایی، تعیین ارقام مقاوم و تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف قارچ *Fusrium oxysporum* f.sp. *lentis* جدا شده از عدس از مناطق مختلف ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی. دانشگاه تربیت مدرس. 150 ص.

Błaszkowski, J., Chwat, G. and Góralska, A. 2015. *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. Mycological Progress. 14(4): 18.

Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M. and Railean-Plugaru, V. 2017. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. Journal of AOAC International. 100(6): 1607-1623.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19:11-15.

Ehgartner, D., Herwig, C. and Fricke, J. 2017. Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry - the fast alternative to microscopic image analysis. Applied Microbiology and Biotechnology. 101(20): 7675-7688.

Fraaije, B.A., Lovell, D.J. and Baldwin, S. 2002. *Septoria epidemics* on wheat: Combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape. Plant Protection Science-Prague. 38: 421-424.

Henson, J.M. 1989. DNA probe for identification of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. Applied and Environmental Microbiology. 55(2): 284-288.

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., and Fields, M. W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology. 72: 3832-3845.

Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C. and Schüßler, A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 183(1): 212-223.

Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., and Willems, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58(1): 200-214.

Moyer, C.L., Dobbs, F.C., and Karl, D.M. 1994. Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. Applied and Environmental Microbiology. 60: 871-879.

Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearumin* cereals using PCR assays. Physiological and molecular plant pathology. 53(1): 17-37.

Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. Journal of natural products. 80(3): 756-770.

Richardson, A.E., Viccars, L.A., Watson, J.M. and Gibson, A.H. 1995. Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. Soil Biology and Biochemistry. 27(4): 515-524.

Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K. and Marimuthu, P. 2014. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. Journal of Applied and Natural Science. 6(1): 290-293.

Tannock, G.W. 1999. Identification of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. Current Issues in Molecular Biology. 1(1) 53-64.

Tommerup, I.C., Barton, J.E. and O'brien, P.A. 1995. Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. Mycological Research 99(2): 179-186.

Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. and Kataoka, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. Journal of Bacteriology 181 (1): 78-82.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitiv DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acid Res. 19: 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F., and Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cellular Biology. 5: 25-40.

Vienne, D., 2003. Molecular Markers on Plant Genetics and Biotechnology. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, 235p.

Ward, E. and Gray, R.M. 1992. Generation of a ribosomal DNA probe by PCR and its use in identification of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. Plant Pathology. 41(6): 730-736.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, 18(1): 315-322.