دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال چهارم، شماره اول، بهار وتابستان 1395
صص 66-57

معرفی روش ساده و آسان برای استخراج DNA ژنومی در قارچ‌های رشته‌ای

سعید غفوری هرات[1]، طاهره بصیر نیا[*2]، سید محمد رضا موسوی[2]
تاریخ دریافت: 93/11/15 تاریخ پذیرش:94/2/17

چکیده

امروزه روش‌های مولکولی لازمه انجام بسیاری از تحقیقات می‌باشد. اساس کار اکثر این آزمایشات و تحقیقات مولکولی بر پایه استخراج DNA می‌باشد، از این رو انتخاب و کشف روش جدیدی که در عین نتیجه بخش بودن، کم هزینه، ساده، کم خطر و سریع نیز باشد بسیار حائز اهمیت است. تکنیک‌های معمولی که در بخش کشاورزی جهت استخراج DNA قارچ‌های رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل C-TAB، فنل کلروفرم و کیت‌های آزمایشگاهی استخراج DNA می‌باشد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند، در این مقاله روشی جهت استخراج DNA از قارچ‌های رشته‌ای پادزیست، گندرو و بیماری‌زای گیاهی معرفی می‌گردد که تلفیقی از روش‌های مذکور به منظور تسهیل و عدم استفاده از ازت مایع و فنل جهت استخراج DNA می‌باشد که در مورد مخمرها نیز استفاده می شود. این روش، روش خرد کردن با گریندر نام دارد که ایمن‌تر، کم هزینه‌تر و سریع‌تر بوده و DNA حاصله از درجه خلوص نسبتا بالایی برخوردار است. خلوص و کیفیتDNA استخراج شده توسط این روش به کمک اسپکتروفتومتر بررسی گردید و به کمک آغازگرهای اختصاصی و PCR، ناحیه‌ی ITS از DNA ریبوزومی و ژن β-tubulin در DNA استخراج شده، تکثیر گردید. با توجه به نتایج به دست آمده از اسپکتروفتومتر و کیفیت باندهای حاصل از محصول PCR در ژل آگاروز، می‌توان این روش را به‌عنوان یک روش عملی و مناسب جهت استخراج DNA قارچ‌های رشته ای بکار برد.

واژه‌های کلیدی: گریندر، قارچ های رشته ای، C-TAB، PCR، استخراج DNA، ITS.

[1]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
[2]- استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.
[**]- نویسنده مسئول مقاله: tbasirnia_829@yahoo.com

مقدمه

قارچ‌های رشته ای مهمترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند که به قسمت‌های مختلف گیاهی (ریشه، ساقه، آوندها، برگ و سایر اندام ها) آسیب می‌رساند (Souza-Motta *et al*., 2003). از مهمترین این قارچ‌ها می‌توان به جنس‌های *Fussarium* spp.، *Rhizoctonia* spp.، *Chaetomium* spp.، *Macrophomina* spp.، *Aspergillus* spp.، *Alternaria* spp. و بسیاری موارد دیگر اشاره کرد (Ahmed, 2014; Souza-Motta *et al*., 2003). در بسیاری از تحقیقات آزمایشگاهی، انجام آزمایشات مولکولی امری مهم و ضروری است و اساس کار آزمایشات مولکولی نیز استخراج DNA می‌باشد. جهت انجام بررسی های مختلف در زمینه شناسایی ملکولی، مهندسی ژنتیک و امور تشخیصی و تحقیقی همچون RLFP، PCR و Rapid استخراجDNA با کیفیت و خلوص بالا از نمونه های مورد نظر بسیارحائز اهمیت است. در آزمایشگاه‌ها از روش‌های مختلفی برای استخراج DNA قارچ‌های رشته‌ای همچون روش فنل کلروفرم، C-TAB و استفاده از کیت‌های استخراج DNA استفاده می‌شود (Silva *et al*., 2012). که به طور معمول مشکلات استفاده از ازت مایع (Yanisko *et al*., 2011)، مواد سمی و بدبو همچون فنل، کلرفرم و مرکاپتواتانول (Gauthier, 2007) و همچنین گران بودن آنها از جمله مشکلاتی است که در روش‌های مذکور وجود دارد. همچنین در این روش‌ها باقیمانده‌ی فنل می‌تواند در فرایند پی سی آر سبب ایجاد اختلال در عمل آنزیم تگ پلیمراز گردد (Ahmed, 2014). روش استخراج DNA به وسیله‌ی خرد کردن با گریندر یک روش معمول جهت استخراج DNA مخمرها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی می‌باشد که مشکلات مذکور را ندارد. همچنین به علت اینکه قارچ های مورد آزمایش در این تحقیق نسبت به مخمر ها دارای دیواره سلولی بسیار ضخیم تر و با ساختار متفاوت تری هستند (Adams, 2004)، مدت زمان له کردن توده بافتی قارچ با گریندر را بیشتر کرده تا له شدن سلول و آزاد سازی DNA آن بهتر صورت گیرد. در مجموع سعی شد این روش نیز بر روی قارچ‌های رشته‌ای (پادزیست، گندرو و بیماری‌زای گیاهی) بررسی گردد و کارآیی آن مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

تعداد ده جدایه رشته‌ای از گروه‌های بیمارگر گیاهی، پادزیست و گندرو برای انجام این آزمایش انتخاب گردیدند. این ده جدایه که از کلکسیون قارچ‌های زنده‌ی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه شدند عبارت بودند از *Fussarium* spp.، *Rhizoctonia solani*، *Trichoderma harzianum*، *Chaetomium* spp.، *Alternaria alternata*، *Paecilomyces* spp.، *Macrophomina* spp.، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus oryzae* و *Aspergilus ochraceus*.

استخراج DNA

استخراج DNA از پرگنه‌های 5 روز کشت داده شده بر روی محیط کشت Potato dextrose agar (PDA) استفاده شد. بلوک کوچکی به ابعاد 0/5 در 0/5 میلیمتر از محیط کشت حاوی ریسه یا اسپور قارچ برداشته شد،

درون تیوب‌های یک و نیم میلی لیتری انداخته شد، 100 میکرولیتر بافر لیز (حاوی100 میلی مولار تریس، 20 میلی مولار EDTA، 100 میلی مولار NaCl و 2 درصد SDS) به آن اضافه گردید (Amer *et al*., 2011) و با گریندر الکتریکی ریسه‌های قارچ خرد و له شد (در صورت نبود گریندر می توان با دست، سر گریندر را درون تیوب‌ها چرخاند که در این صورت باید مدت زمان بیشتری این عمل را انجام داد تا عمل له کردن به خوبی انجام گردد) و سپس تیوب‌ها به مدت بیست دقیقه در آب جوش 100 درجه سلسیوس قرار داده شد (Almedia *et al*., 2012; Amer *et al*., 2011). در ادامه بعد از اضافه کردن 100 میکرولیتر استات سدیم 2/5 مولار، 60 دقیقه در طرف حاوی یخ و در یخچال نگهداری شد. تیوب‌ها سپس به مدت 5 دقیقه در 12000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی برداشته و به تیوب جدید منتقل گردید و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. 30 دقیقه در فریزر گذاشته و سپس در 10000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی را دور و رسوب نگه داشته شد و در انتها هم به مدت 5 دقیقه در 10000 دور با اتانول 99 درصد و 70 درصد رسوب را آبگیری کرده و بعد از خشک شدن کامل الکل، رسوب در آب مقطر استریل حل شد و تا زمان استفاده در فریزر منفی 80 درجه سیلیسیوس نگهداری گردید (Almedia *et al*., 2012; Amer, *et al*., 2011).

الکتروفورز دی ان ای استخراجی

بعد از اتمام مراحل استخراج، جهت اطمینان از وجود DNA و میزان خلوص آن، DNA استخراجی در ژل آگاروز یک درصد به مدت 45 دقیه و با ولتاژ 70 الکتروفورز شد و سپس باندهای حاصل بعد از رنگ آمیزی در زیر نور ماورا بنفش مشاهده شد (Skoog, 1985).

تعیین خلوص DNA استخراجی

جهت تعیین خلوص DNA استخراج شده با این روش، از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ (مدل Nanodrop 2000C ساخت شرکت Thermo Secentific) استفاده گردید. به این صورت که مقدار جذب در طول موج $\frac{260}{280}$ نانومتر و $\frac{260}{230}$ نانومتر محاسبه و به دنبال آن غلظت DNA استخراجی اندازه گیری شد (Anonymous, 2000; Desjardins and Conclin, 2010).

تکثیر ناحیه ITS و β-tubulin

جهت PCR به ازای هر نمونه 2 میکرولیتر از DNA استخراج شده را با 5 میکرولیتر بافر پی سی آر، 1/5 میکرولیتر کلرید منیزیم، 1 میکرولیتر dNTP، 0/5 میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (جهت یک نمونه 0/5 میکرولیتر پرایمر رفت و 0/5 میکرولیتر پرایمر برگشت)، 0/5 میکرولیتر تگ پلیمراز استفاده گردید و در نهایت با آب دیونیزه استریل حجم کل نمونه به 50 میکرولیتر رسانده شد و پی سی آر انجام گردید. برنامه پی سی آر شامل یک سیکل 95 درجه سانتی گرادی به مدت 5 دقیقه، 35 سیکل 95 درجه به مدت 30 ثانیه، 58 درجه به مدت 30 ثانیه، 45 ثانیه 72 درجه، و 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد بود و در انتها نیز دما روی 4 درجه سانتی گراد تنظیم می شود. تکثیر نواحی ITS و β-tubulin به ترتیب توسط آغازگرهای جهانی (universal) ITS1، ITS2 و Bt2a،

Bt2b انجام گردید (جدول 1). جهت رویت باندهای حاصل از واکنش 4 میکرولیتر از محصول پی سی آر با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید و روی ژل آگاروز 1.5 درصد و درون تانک حاوی بافر TBE (تریس، بوریک اسید و EDTA) در ولتاژ 75 ولت و مدت 60 دقیقه الکتروفورز گردید (Shinawi, 2010) و باندها در دستگاه ژل داک مشاهده و از آن‌ها عکس برداری شد.

جدول 1- توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های ITS و β-tubulin در قارچ‌های رشته‌ای.

نام آغازگر	توالی آغازگر
ITS1	5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’
ITS2	5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’
Bt2a	3’-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-5’
Bt2b	3’-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-5’

نتایج و بحث

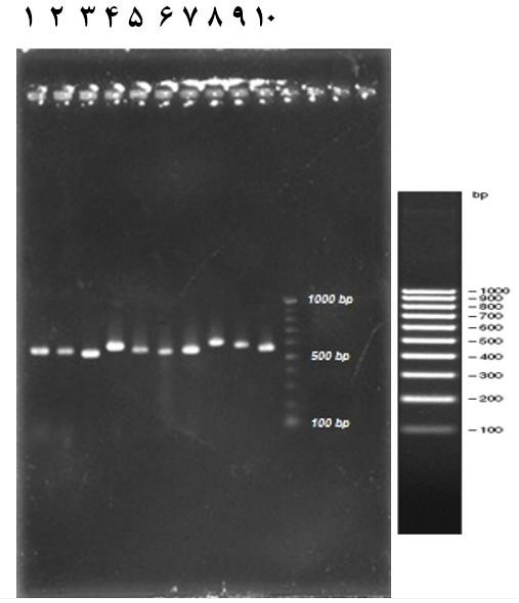
طبق نتایج استخراج DNA (شکل 1) و بررسی خلوص آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ، با توجه به اینکه نسبت جذب در دو طول موج $\frac{260}{280}$ نانومتر و $\frac{260}{230}$ نانومتر در محدوده 1.8 تا 2 قرار داشت (جدول 2) لذا می‌توان گفت که کیفیت و خلوص DNA استخراجی در سطح قابل قبولی قرار دارد (Clark and Christopher, 2000).

شکل 1- باندهای حاصل از الکتروفورز DNA استخراجی ده جدایه قارچ: 1-*Aspergillus flavus* 2- *Aspergillus oryzae* 3-*Aspergillus ochraceus* 4- *Alternaria alternata* 5-*Rhizoctonia solani* 6-*Fussarium* sp. 7- *Macrophomina* sp. 8-*Chaetomium* sp. 9-*Paecilomyces* sp. 10- *Trichoderma harzianum*

جدول 2- نتایج اسپکتروفتومتر DNA استخراجی ده جدایه قارچ با دستگاه نانودراپ.

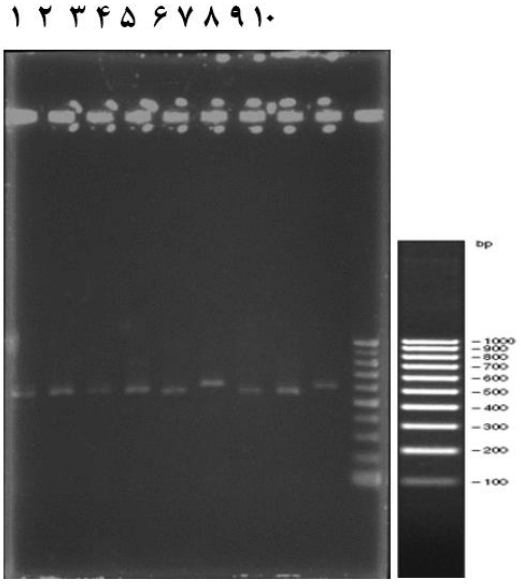
قارچ نمونه	غلظت DNA (ng/µl)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰نانومتر	نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰نانومتر
Trichoderma harzianum	41/1	1/99	1/68
Rhizoctonia solani	28/8	1/49	1/63
Fussarium sp.	37/8	1/87	1/81
Paecilomyces sp.	41/1	1/79	1/91
Chaetomium sp.	29/2	1/93	1/66
Alternaria alternate	31/1	1/91	1/93
Macrophomina	32/1	1/82	1/61
Aspergillus flavus	30/1	1/82	1/96
Aspergillus oryzae	32/2	1/98	1/73
Aspergilus ochraceus	41/9	1/92	1/75

در ادامه نیز DNA استخراج شده به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت و باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR ژن‌های ß-tubulin و ناحیه ITS نیز در ژل آگاروز به وضوح مشاهده گردید (شکل 2و 3).



شکل 2- باندهای محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ناحیه ITS ژنوم ده جدایه قارچ: 1-*Aspergillus flavus* 2-*Fussarium* sp.-6 *Rhizoctonia solani*-5 *Alternaria alternata*-4 *Aspergillus ochraceus*-3 *Aspergillus oryzae* *Trichoderma harzianum* -10 *Paecilomyces* sp.-9 *Chaetomium* sp.-8 *Macrophomina* sp. -7

با توجه به اینکه نواحی ITS در ژنوم دارای نسخه‌های متعدد می‌باشد و در صورت شکستگی مولکول DNA نیز قابل تکثیر می‌باشد. از ژنی همچون ß-tubulin که نسخه‌های متعددی در ژنوم ندارد نیز جهت پی سی آر استفاده شد که این امر نشان دهنده سالم ماندن و عدم شکسته شدن مولکول DNA در طی فرایند استخراج می باشد. در اکثر روش‌های معمول استخراج از فنول، کلروفرم و یا مرکاپتواتانول جهت از بین بردن پروتئین و لیپیدهای سلول استفاده می‌شود که با توجه به بدبو و سمی بودن، خطرات و مشکلات آنها در طی روند استخراج بسیار زیاد می‌باشد. همچنین باقیمانده‌ی فنل می‌تواند در فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی مراز سبب ایجاد اختلال در عمل آنزیم تگ پلیمراز گردد (Ahmed, 2014). استفاده از ازت مایع جهت خرد کردن ریسه‌های قارچی نیز در بسیاری از موارد خطرناک و ملزم به صرف وقت و هزینه می باشد (Amer *et al*., 2011).



شکل 3- باندهای محصول پی سی آر ژن ß-tubulin ژنوم ده نمونه قارچ: 1-*Aspergillus flavus* 2- *Aspergillus oryzae* 3-*Aspergillus ochraceus* 4-*Alternaria alternata* 5-*Rhizoctonia solani* 6-*Fussarium* sp. 7- *Macrophomina* sp. 8-*Chaetomium* sp. 9-*Paecilomyces* sp. 10- *Trichoderma harzianum*

بنابراین روش حاضر می‌تواند به علت نداشتن این مشکلات، علاوه براینکه بسیار ساده، سریع و بی‌خطر می‌باشد، کیفیت DNA استخراجی حاصل از آن نیز در حد مطلوب بوده و همچنین بسیار کم هزینه است. چون در این روش از گریندر الکتریکی به جای ازت مایع جهت خرد کردن بافت قارچی استفاده میشود و همچنین مراحل استفاده از فنل، کلرفرم و مرکاپتواتانول حذف گردیده است. براساس نتایج این تحقیق استفاده از این روش کاملا موفقیت آمیز بوده و می‌توان از آن به عنوان روش عملی و قابل استفاده جهت استخراج DNA قارچ‌های رشته‌ای استفاده کرد. اما به منظور معرفی و جایگزین کردن این روش با روش‌های معمول و همچنین جهت کاربرد در سایر قارچ‌های لازم است طی بررسی و تحقیقات بیشتری، کیفیت و کارایی این روش با روش‌های مذکور مورد مقایسه و ارزیابی دقیق‌تر و بیشتر قرار گیرد.

References

1. Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology 150: 2029–2035.
2. Ahmed O, Atif HA and Mogahid ME. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. African Journal of Microbiology Research 8: 598–602.
3. Almeida da Silva G, Bernardi TL, Schaker PDC, Menegotto M and Valente P. 2012. Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. Brazilian Archives of Biology and Technology 2: 319–327.
4. Amer EO, Mahmoud MA, El-Samawaty AM and Sayed SR. 2011. Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. African Journal of Biotechnology 10: 14337–14341.
5. Anonymous. 2000. Assessment of nucleic acid purity. T042-Technical Bulletin, Wilmington, Delaware: Thermo Fisher Scientific – NanoDrop Products.
6. Clark W and Christopher K. 2000. An introduction to DNA: spectrophotometry, degradation, and the 'Frankengel' experiment. pp. 81–99 In SJ Karcher (eds). Tested studies for laboratory teaching, Volume 22. Proceedings of the 22nd Workshop / Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Edmonton: Publication of University of Alberta.
7. De Souza C, De Queiroz Cavalcanti M, Fernandes M, Massa Lina D, Nascimento J and Laranjeria D. 2003. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolyse inulin. Brazilian Journal of Microbiology 34: 273–280.
8. Desjardins P and Conklin D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. Journal of visualized experiments, (45): 2565
9. Diba K, Namaki A, Ayatolahi H and Hanifian H. 2014. Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of candida species causing vulvovaginal candidiasis and recurring vulvovaginal candidiasis. Iranian Journal of Medical Microbiology 8: 45–50.
10. Fredricks DN, Smith C and Meier A. 2005. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. Journal of Clinical Microbiology 43: 5122–5128.
11. Gauthier ER. 2007. Biochemistry I. Department of Chemistry and Biochemistry. [cited 2015 March 18] Available from: http://www.foodelphi.com/biochemistry-problems-and-solutions-eric-r-gauthier-ph-d/
12. Kamalzadeh S and Sabokbar A. 2014. Molecular survey of pathogen species of *Aspergillus* isolated from diabetic foot lesion using nested PCR method. Journal of Medical Sciences Torbat, 1: 25–32.
13. Michaelsena A, Pinzarib F, Ripkaa K, Lubitza W and Pinar G. 2006. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. International Biodeterioration & Biodegradation 58: 133–141.
14. Moallemzadeh A, Yadegari M, Rajabi M and Kachuei R. 2014. The simple molecular method for confirming identification of the main species of fungi *Candida*, *Aspergillus* and Dermatophyte. The Journal of Urmia University of Medical Sciences 25: 105–112.

15. Płaza1 G, Upchurch R, Brigmon R, Whitman W and Ulfig K. 2004. Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. Polish Journal of Environmental Studies 13: 315–318.
16. Prillinger H, Schweigkofler H, Breitenbach M, briza P, Staudacher E, Lopandic K, Molnaur O, Weigang F, Ibl M and Ellinger A. 1997. Phytopathogenic filamentous (Ashbya, Eremothecium) and dimorphic fungi (Holleya, Nematospora) with Needle-shaped ascospores as new members within the Saccharomycetaceae. Yeast 13: 945–960.
17. Ragazzo-Sanchez J, Gutierrez-Escatel A, Luna-Solano G, Gómez-Leyva J and Calderon-Santoyo M. 2011. Molecular identification of the fungus causing postharvest rot in jackfruit. Journal of Revista Mexicana de Micología 34: 9–15.
18. Serrano R, Gusmão L, Amorim A and Araujo R. 2011. Rapid identification of *Aspergillus* fumigatus within the section Fumigati. BMC Microbiology 11:82. doi: 10.1186/1471-2180-11-82.
19. Shinawi T. 2010. DNA Gel Electrophoresis. Molecular Biology Lab, 5 p.
20. Skoog DA. 1985. Principle of instrumental Analysis. USA Saunders College Publishing.
21. Sridhar P. 2006. Polymerase Chain Reaction (PCR). Department of Microbiology jjmmc, 3 p.
22. Yanisko P, zheng SY, Dumoit J and Carlson B. 2011. Nitrogen: A security blanket for the chemical industry. Chemical Engineering Progress 107: 50–55.
23. Zador E. 2011. The polymerase chain reaction. Basic biochemical methods and ischemic heart models, 59 p.

A simple method to extract filamentous fungal genomic DNA

S. Ghafoori Harat[1], T. Basirnia*[2], M.R. Moosavi[2]

Abstract

Today, the application of molecular methods is a common and necessary part of many routine researches. DNA extraction is the foundation for most of such research studies. As a result, it is of great significance to discover and select proper techniques that are productive, inexpensive, straightforward, safe and rapid at the same time. Agricultural research and experiments are no exception in this respect. C-TAB, phenol-chloroform and DNA extraction kits are conventional techniques in agriculture for extracting DNA from filamentous fungi. Each of these methods has its advantages and disadvantages. In this study, we have developed a novel, straightforward and effective method to extract the DNA from antagonistic-, saprophytic- and plant pathogenic-filamentous fungi. This method is a composition of the aforementioned techniques and is used to avoid the application of liquid nitrogen and phenol. It is called squish with grinder and is a safer, more affordable and quicker method that results in relatively pure DNAs. The purity of obtained DNA was assessed by spectrophotometry. The ITS region and β-tubuline gene was amplified by PCR. The results of this assessment justify this method as a practical and reliable technique to extract filamentous fungal genomic DNA.

Key words: Antagonist, C-TAB, DNA extraction, filamentous fungi, grinder, ITS.

[1] - MSc Student, Department of Plant Pathology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

[2] - Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

*Corresponding author: tbasirnia_829@yahoo.com