

## 土壤에 存在하는 *Chaetomium*과 *Fusarium*의 分子生物學的 모니터링 技術開發

李善株 · 高昇柱 · 柳震彰\*

### Molecular Monitoring of Soil-inhabiting *Chaetomium* and *Fusarium*

Seon-Ju Lee, Seung-Joo Go and Jin-Chang Ryu

**ABSTRACT** : In order to detect soil-inhabiting fungi a method based on the PCR (polymerase chain reaction) was developed. Eight soil samples were collected from greenhouses, barley-growing field, and roadside in Kyungnam Province. Soil samples were diluted with skim milk and total microbial DNAs were directly extracted. The genera, *Chaetomium* and *Fusarium*, were selected for the reference fungi, of which the genus-specific primers amplifying 5.8S and partial ITS (internal transcribed spacer) regions were designed. The genus-specific bands were amplified by primers developed in this study and nested PCR method. The molecular monitoring system was practically applied onto soil samples collected. The sensitivity, simplicity, and speediness of the monitoring system was proved.

**Key words** : *Chaetomium*, *Fusarium*, Molecular monitoring system, PCR.

### 縮 言

微生物의 寶庫이자 식물 생장의 根源力인 土壤은 오래 전부터 農業, 病理, 生態, 分類 등 많은 분야에서 관심의 대상이 되어왔으며 최근에는 地球의 環境保存 차원에서 활발한 연구가 되어 오고 있다. 토양내 존재하는 微生物의 연구를 위한 始發作業인 토양에서 미생물의 分離에는 稀釋法과 評判法이 광범위하게 사용되었다 (Waksman 1916, Warcup 1950). 그러나, 이 방법들은 절대적으로 적은 數로 존재하는 미생물이 看過될 수 있는 것과 人爲的인 培地나 培養法에 의해 분리되지 않는 미생물은 確認될 수 없다는 短點을 가지고 있다. 또한, 특정 미생물을 분리하기 위해서는 적절한 選拔培地가 필요한 것등이 자연 환경내 미생물의 연구에 障礙要因이 되어왔다.

分子生物學的 技術은 수생 또는 토양등의 자연 환

경에 존재하는 미생물을 확인할 수 있는 도구로서 80년대 중반부터 여러 분야에서 다양하게 이용되어 왔다 (Steffan & Atlas 1991). 이들 중 PCR기술은 신속성과 간편함에도 培養의 과정을 거치지 않고 적은 양의 DNA만으로도 미생물의 존재를 확인할 수 있기 때문에 배양이 안되거나 너무 적은 양이 존재하여 일반적으로 사용하는 分離法에 의해 확인할 수 없는 미생물도 檢定할 수 있는 長點을 가지고 있다.

토양내 존재하는 미생물의 分子生物學적 모니터링의 核心過程인 DNA (soil total microbial DNA) 추출법은 지난 20여년간 꾸준한 발전을 해왔다. 그 방법을 살펴보면, 토양 시료를 일정기간 배양하여 대상 미생물의 群集數를 늘리거나 대상 미생물을 토양에서 純粹分離 후 배양하여 DNA를 間接的으로 추출하는 방법과, 배양이나 순수분리 과정을 거치지 않고 미생물이 토양에 존재하는 상태에서 DNA를 直接 추출하는 방법이 사용되어 왔다 (Johnston & Aust 1994, Gardes et al.,

\* 農業科學技術院(National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea)

1991; Holben et al., 1988; Picard et al., 1992; Smalla et al., 1993; Tsai & Olson 1991). 直接抽出法은 토양에서 DNA와 함께 추출되는 腐植酸과 같은 不純物이 존재하여 PCR반응을 阻害하는 것이 가장 큰 障礙要因으로 알려져 있으나 間接 抽出法에 비해 實驗工程이 짧고 簡便하기 때문에 여러학자들에 의해 다양하게 이용되어 왔다 (Tebbe & Vahjen 1993; Tsai & Olson 1992). Picard et al. (1992)은 超音波振動, 熱衝擊, 極超短波加熱로 토양 내에 존재하는 미생물의 세포조직을 破壞시켜 DNA를 抽出하고 3단계의 色層分析 (chromatography)을 거쳐 DNA를 淨化 (DNA purification)하였으며, Smalla et al. (1993)은 cesium chloride를 이용한 DNA의 순수분리를 시도하였다. 이들의 방법은 DNA를 직접 추출할 수 있는 편의성이 있으나 DNA 淨化에 소요되는 많은 시간과 복잡한 과정때문에 實用化에는 어려움이 있었다.

Volossiouk et al. (1995)은 이러한 문제점을 보완하여 토양내 미생물 DNA의 직접 추출법을 개발하였다. 이들은 一般生物體에서 DNA를 추출하는 방법과 동일하게 토양에서 미생물 DNA를 추출하였으며, PCR반응시 腐植酸의 反應阻害作用을 최소화하기 위하여 DNA추출액의 濃度を 아주 낮게하여 PCR 반응의 templates로 사용하였다.

본 실험은 Volossiouk et al. (1995)에 의한 토양 미생물 DNA의 직접 추출법을 定着하고, 모니터링을 위한 指標곰팡이로 선정된 子囊菌 *Chaetomium*과 不完全菌 *Fusarium*의 특이 primers를 개발하며, 이들을 기반으로 하여 토양에 존재하는 미생물의 분자 생물학 적 모니터링방법을 확립하기 위하여 실시하였다.

### 材料 및 方法

본 실험은 4단계의 과정을 거쳐 施行되었다. 첫째, 기존의 土壤 稀釋法을 이용하여 토양 내 紙票 곰팡이의 분포를 조사하였고, 둘째, DNA 추출법을 土着化하였으며, 셋째, 지표 곰팡이로 선정된 *Chaetomium*과 *Fusarium*을 확인할 수 있는 특이 primers를 개발하였고, 마지막으로 위의 3단계에서 진행된 결과를 종합하여 8곳의 토양 시료에서 지표 곰팡이의 分子生物學的 모니터링을 실시하였다.

### 1. 土壤內 微生物 DNA의 抽出

경상남도 진주시에 소재하는 施設栽培地 6곳의 토양과 1곳의 自然露地, 1곳의 보리 栽培 土壤을 試料로 사용하였다 (Table 1). 토양내 미생물의 DNA 추출은 Volossiouk et al. (1995)의 方法을 따랐다. 야외에서 채집된 토양을 실온에서 건조한 후 -70℃에서 보관하여 미생물상의 변화를 最少化하였다. 0.25-1 g의 토양을 1.5 ml eppendorf tube에 넣고 0.2% 탈지분유액 250 μl를 첨가한 후 미니 막자로 약 5분간 磨碎하였다. 최종적으로 脫脂粉乳液 1 ml을 넣어 磨碎土壤과 잘 섞어주었다. 室溫에서 10분간 遠心分離한 후 上騰液은 새 tube에 옮기고, 沈澱된 토양 시료에 탈지분유액 500 μl을 재차 넣어 vortexing하여 잘 혼합하였다. 2차 토양희석액도 원심분리후 새 tube에 回收하였다. 回收된 上騰液에 同量의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.7; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1% 2-mercaptoethanol; or 1% polyvinylpolypyrrolidone)를 넣어 65℃에서 1시간동안 反應시킨 후 同量의 chloroform: phenol(1:1, v:v)을 첨가하여 2-3회 흔들어준 다음 4℃에서 5분간 원심 분리하였다. 上騰液에 3 M sodium acetate와 0.5 volume의 isopropanol을 添加하여 잘 섞어준 후 15분간 원심분리하였다. 상등액은 廢棄하고 pellets은 70% 에탄올로 1회 세척하여 진공 하에서 20분간 건조시킨 후 TE buffer 20 μl를 넣어 녹인 후 -20℃에서 보관하여 試料로 사용하였다.

Table 1. The list of soil samples collected for the monitoring of *Chaetomium* and *Fusarium*

Vegetation	Habitat
1 musk melon	green house
2 cucumber	green house
3 barley field	field
4 red pepper	greenhouse, <i>Phytophthora</i> -blight occurred
5 red pepper	greenhouse, non-root area
6 red pepper	greenhouse, root area
7 strawberry	greenhouse
8 roadside	field

### 2. 指標곰팡이 屬特異 先發體(primer)의 開發

遺傳子 鹽基序列 資料와 MacDNASIS 프로그램을 이용하여 指標곰팡이, *Chaetomium*과 *Fusarium*를 특

異의으로 확인할 수 있는 primers를 제작하였다 (Table 2). *Fusarium*屬 선발을 위해 *Fusarium*屬에만 특이적으로 존재하는 ITS1 영역의 5' 末端部位 18mer 염기서열 (FUS3)과 ITS2 영역의 3' 말단부위 18mer 염기서열 (FUS2)이 특이 primers로 사용되었다 (Fig. 1). *Chaetomium*屬의 선발은 ITS2 영역 3' 부위 18mer 염기서열 (ICHA4)과 곰팡이 특이 primer인 ITS5를 짝으로 하여 사용하였다 (Fig. 2).

Table 2. Primers for amplification of *Fusarium* or *Chaetomium* and fungal ribosomal DNA genes

Gene	Primer	Reference
FUS2	5' GGGTTTAACGGCGTGGCC 3'	<i>Fusarium</i> -specific
FUS3	5' TTGCCTCGGCGGATCAGC 3'	<i>Fusarium</i> -specific
ICHA4	5' AGGTGGTTTAACGGCCGG 3'	<i>Chaetomium</i> -specific
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	fungi-specific
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	fungi-specific
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	fungi-specific
NS1	5' GTAGTCATATGCTTGCTC 3'	fungi-specific
NS4	5' CTTCCGTCATTCCTTTAAG 3'	fungi-specific

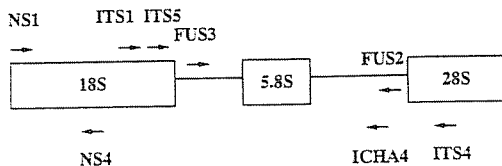


Fig. 1. Locations on nuclear rDNAs of PCR primers given in Table 2. The arrowheads represent the 3' end of each primer. The large rDNA is truncated in figure.

### 3. PCR法을 利用한 *Chaetomium*과 *Fusarium*의 모니터링

既存에 사용되어온 形態的 方法에 의한 모니터링을 실시하기 위하여 토양 시료 0.25 g을 0.1% water agar液에 일정 濃度 ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ )로 稀釋한 후 희석액 1 ml씩을 곰팡이 一般選擇培地인 Rose bengal Agar에 3반복으로 塗抹하였다. 이들 培地들은 실온에서 3일 정도 培養하고 적당한 크기로 자란 colonies는 解剖顯微鏡의 관찰을 거친 후 V8배지에 接種시켜 純粹分離하였다. 순수 분리한 곰팡이는 현미경 檢鏡을 통하여 同定하였다. 일반선택배지외에 *Fusarium*에 選擇性을

가지는 Pepton 培地 (pepton 15 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g;  $KH_2PO_4$  1 g; pentachlorobenzene 1 g; streptomycin 300 mg; agar 20 g; water 1 l), Dextrose 배지 (dextrose 20 g;  $KH_2PO_4$  0.5 g;  $NaNO_3$  2.0 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g; yeast extract 1.0 g;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.0 ml; agar 20 g; water 1 l)와 *Chaetomium*에 選擇性을 가지는 cellulose 培地 (cellulose 10 g;  $(NH_4)_2SO_4$  0.5 g; L-asparagine 0.5 g;  $KH_2PO_4$  1.0 g; KCl 0.5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g;  $CaCl_2$  0.1 g; yeast extract 0.5 g; water 1 l; pH 6.2)가 사용되었다.

분자 생물학적 모니터링을 실시하기 위하여 이미 記述한 方法에 의해 추출되어 -20℃에서 保管 중인 DNA를 사용하였다. DNA시료는 PCR을 阻害하는 불순물의 작용을 最小化하기 위해 10배로 再稀釋하여 templates로 사용하였다. PCR反應物은 총 50  $\mu$ l로서 template 2  $\mu$ l와 10 $\times$  buffer, 25 mM  $MgCl_2$ , 2.5 mM deoxynucleoside triphosphates, 0.5  $\mu$ M primers와 1.25U *Taq* polymerase 48  $\mu$ l로 組成되었다. 반응 조건은 95℃에서 1분, 54℃에서 1분, 72℃에서 2분씩 35회 시켰으며 반응의 처음과 나중은 각각 95℃에서 denaturation 4분, 72℃에서 extension 9분간 실시하였다. 특이 bands의 增幅을 위하여 곰팡이 특이 primers, ITS1과 ITS4를 外廓적으로 한 nested PCR을 실시하였다. PCR 증폭된 遺傳子 短篇들은 0.8-1% agarose gel에서 電氣泳動한 후 Ethidium Bromide에 약 2분간 染色하여 UV光 하에서 確認하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 土壤內 微生物 DNA의 抽出

토양에서 추출한 DNA를 0.8% agarose gel에 電氣泳動하였을 때 肉眼으로 bands를 확인할 수 없었기 때문에 DNA의 추출 여부를 확인하기 위하여 PCR반응을 실시하였다. 곰팡이에 특이적으로 작용하는 NS1과 NS4를 primers로 한 PCR반응에서 약 1200 base pairs 곰팡이 특이 bands가 나타나는 것으로 미루어 토양의 미생물 DNA가 효과적으로 추출되었음을 確認할 수 있었다 (Fig. 2). PCR反應 前의 電氣泳動에서 bands 상으로 DNA가 확인되지 않은 것은 試料量이 부족하여 토양 미생물 DNA의 양도 아주 적었기 ため으로 生

각되었다. 따라서, 실험에 사용되는 토양 시료의 양을 0.5 g, 1.0 g으로 증가시킨 후 DNA 추출을 시도하였다. 그러나, 증가된 시료에서 추출된 DNA를 전기영동했을 때 역시 육안으로 확인되는 bands가 없었기 때문에, 시료량의 증가는 토양 추출물 내 腐植酸의 양만 증가시킬 뿐 토양 내 미생물 DNA(soil total microbial DNA)의 회수에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

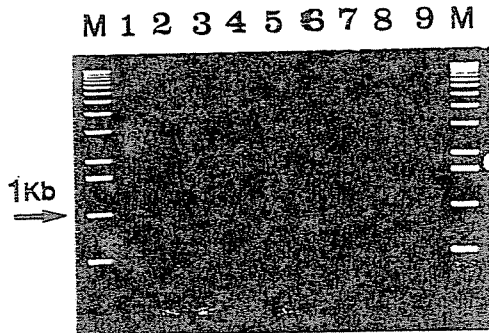


Fig. 2. Fungi-specific bands of 1200 base pairs indicating the effectiveness of soil total microbial DNA extraction. Bands amplified the 5' end of 18S rDNA region using universal primers, NS1 and NS4 (M. markers; 1. musk melon; 2. cucumber; 3. barley field; 4-6. red pepper; 7. strawberry; 8. road side; 9. known fungal DNA).

한편, Denhardt(1966)에 의하면 1% PVP (polyvinylpyrrolidone), 1% BSA 와 1% Ficoll을 혼합한 運搬體는 多原子價重合體로서 核酸의 吸着이나 分解作用으로 인한 DNA의 流失을 最少化하는 하는 것으로 알려져 있고, Volossiuk et al (1995)은 실험에서 이 運搬體의 사용하여 Taq polymerase의 안정화와 진한

bands樣相을 얻을 수 있었으며, 값싸고 쉽게 구할 수 있는 脫脂粉乳가 이들의 代用으로 사용될 수 있음을 보고하였다. DNA추출 前處理에서 토양 희석액으로 사용되는 탈지분유는 토양 내 존재하는 부식산과 같은 高分子物質과 結合하여 토양 내에 PCR반응을 阻害하는 腐植酸의 실질적 減少를 가져와 PCR반응의 安定化를 가져오는 것으로 여겨진다. Holben et al (1988)은 토양 有機酸의 除去를 위해 DNA抽出 前段階에서 PVP를 사용한 것을 報告하였다. 부식산등 토양 내 고분자 물질의 저해역할을 줄이기 위한 방법으로 Volossiuk et al. (1995)이 사용한 template 稀釋法이 가장 손쉽고 큰 효과를 내는 것으로 생각된다.

2. 指標곰팡이 屬-特異 primers의 開發

纖維素 分解能을 가지는 子囊菌인 *Chaetomium*은 토양에 광범위하게 분포하며 溫帶地方에서는 성장중인 식물체에 특별한 해를 끼치지 않는 것으로 알려져 있다. 土壤 發源 不完全菌 *Fusarium*은 식물에 모잘룩병, 뿌리썩음병, 시들음병 등을 일으키는 곰팡이로서 많은 연구가 이루어졌다.

*Chaetomium*속 특이 3' primer, ICHA4와 곰팡이 특이 primer, ITS5를 짝으로 ribosomal DNA의 5.8S, ITS1과 ITS2의 일부 영역 약 500 base pairs가 增幅되었다. 이들 primers의 특이성을 확인하기 위하여 多樣한 菌株와의 PCR반응을 실시하였으며 系統學的으로 가까운 類縁關係를 가지는 *Sordaria*屬과도 구분되는 bands를 형성하였다. 또한, 100여종이 넘는 *Chaetomium*屬내에서 서로 다른 section에 소속되는 종들도 같은 bands로 증폭되어 특이 primer임을 확인하였다 (Fig. 3). 기존에 발표된 유전

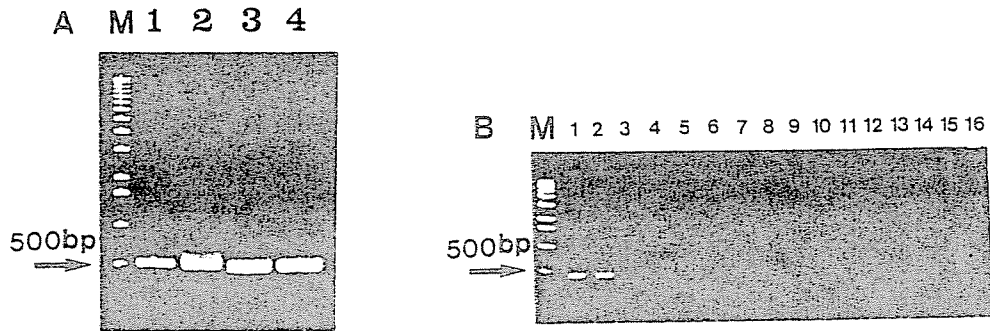


Fig. 3. A. *Chaetomium*-specific bands of about 500 base pairs verifying the specificity of primers, ICHA4 and ITS5 (M. marker; 1. *Chaetomium hamadae*; 2. *C. bostrychodes*; 3. *C. funicola*; 4. *C. globosum*) B. *Fusarium*-specific bands of about 430 base pairs verifying the specificity of primers (M. marker; 1-5. *Fusarium* spp.; 6. *Myrothecium*; 7. *Scopulariopsis*; 8. *Aspergillus*; 9. *Microascus*; 10. *Petriella*; 11. *Sordaria*; 12. *Nodulisporium*; 13. *Trichoderma*; 14. *Monocillium*; 15. *Chaetomium*; 16. negative control).

자 염기서열 자료를 바탕으로 제작된 *Fusarium*屬 특이 primers인 FUS2와 FUS3로 ribosomal DNA 5.8S, ITS1과 ITS2의 일부 영역, 약 400 base pairs를 증폭하였다. Primers의 특이성을 檢證하기 위하여 불완전균과 자낭균 15종의 균주를 대상으로 PCR반응을 실행했을 때 *Fusarium*속에만 특이적으로 bands가 나타나는 것으로 미루어 FUS2와 FUS3의 특이성을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

### 3. PCR法을 利用한 모니터링

*Fusarium*과 *Chaetomium*속 특이 primers를 사용하여 8개의 토양 시료에서의 모니터링을 실시하기 전, 곰팡이 일반선택배지를 이용한 形態的 方法에 의한 모니터링의 결과에서 *Chaetomium*은 토양 시료 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8에서 모두 分離, 同定 되었으며 *Fusarium*은 4와 7의 시료에서만 分離, 同定되었다. 특이 primers를 이용한 분자 생물학적 모니터링에서는 모든 토양 시료에서 *Chaetomium*과 *Fusarium*속 특이 bands가 나타났다 (Fig. 4). 즉, 모든 토양시료에서 2종의 指標 곰팡이가 존재하는 것으로 확인되었다. 이 결과는 일반선택배지에서 檢定되지 않았던 *Fusarium*균이 特別 選拔培地를 이용하여 5, 6, 8 시료에서 追加로 分離 同正된 것을 볼때 PCR기법을 이용한 분자 생물학적 모니터링 방법이 가지는 敏感性은 기존의 形態적 方法을 훨씬 능가하는 것으로 생각되며, 실험에 達되는 時間과 일의 量을 比較했을 때 분자 생물학적 方法이 迅速하고 正確한 方法임을 알 수 있었다. 形態적 方法에 의한 모니터링은 반드시 곰팡이를 分類, 同定

할 수 있는 專門家가 遂行하여야 하고 곰팡이의 純粹 分離와 同定을 위해 최소한 3周이상의 시간이 소요되나, 분자 생물학적 모니터링은 토양시료 採取부터 특이 bands의 確認까지 最大 3日의 시간만이 소요되고, 대상 미생물을 확인할 수 있는 특이 primers나 probes가 준비된 상태에서는 PCR 器機의 操作만 습득한 사람이라면 누구나 모니터링작업을 할 수 있다는 잇점을 가지고 있다. 본 研究를 통하여 얻은 primers나 DNA分離方法을 이용할 경우 자연 환경내 미세한 양으로 存在하는 *Chaetomium* 및 *Fusarium* 을 迅速하게 조사할 수 있으며, 이러한 方法을 계속 開發할 경우 土壤 發源 식물 병원성 微生물의 早期 診斷 및 防除를 가능하게 하며, 여러 가지 환경조건에 따른 微生물의 變移에 관한 研究등에도 폭 넓게 이용될 수 있는 것으로 생각된다.

### 摘 要

土壤 環境내에 存在하는 곰팡이의 모니터링을 위한 分子 生物學的 技術을 開發하였으며, 토양에서 직접 微生물 DNA를 抽出할 수 있는 方法이 確立되었다. 纖維素 分解能을 가지는 *Chaetomium*과 土壤 發源 植物 病原性 *Fusarium*을 모니터링에 사용할 地表 곰팡이로 선정하여, 이들을 特異的으로 確認할 수 있는 primers를 開發하였다. 慶尙南道 진주시에서 收集된 8개의 土壤 試料를 對象으로 모니터링을 實施하였다.

1. 土壤試料를 脫脂粉乳로 稀釋한 후 微生物 DNA

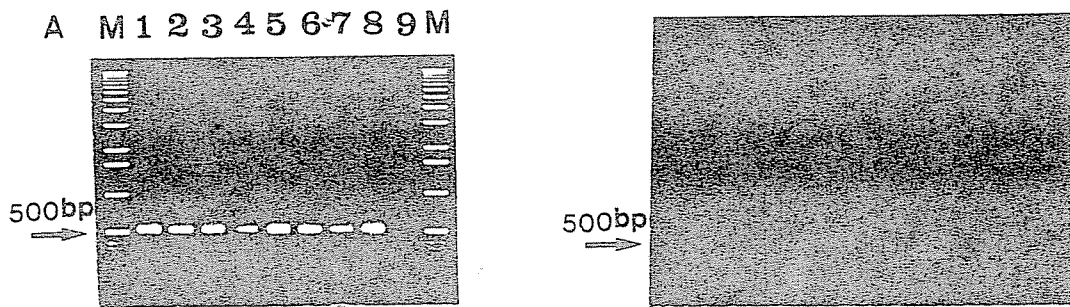


Fig. 4. The detection of *Chaetomium* and *Fusarium* using genus-specific primers and nested PCR method. A. *Chaetomium*-specific bands of about 500 base pairs amplified by primers, ICHA4 and ITS5 (M. markers; 1. musk melon; 2. cucumber; 3. barley field; 4-6. red pepper; 7. strawberry; 8. road side; 9. negative control) B. *Fusarium*-specific bands of about 430 base pairs amplified by specific primers, FUS2 and FUS3 (M. markers; 1. musk melon; 2. cucumber; 3. barley field; 4-6. red pepper; 7. strawberry; 8. road side; 9. negative control).

를 直接 抽出하였다.

2. *Chaetomium*屬의 ITS영역을 特異적으로 增幅시키는 primer, ICHA4를 開發하였다.

3. *Fusarium*屬의 ITS영역을 特異적으로 增幅시키는 primers, FUS2와 FUS3를 開發하였다.

4. 分子生物學的의 모니터링의 迅速性, 便宜性, 敏感性을 실제 土壤試料에서 確認하였다.

### 引用文獻

- Denhardt, D. 1966. A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 : 641 - 646.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns and J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69 : 180 - 190.
- Holben, W. E., J. K. Jansson, B. K. Chelm and J. M. Tiedje. 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 703 - 711.
- Hu, X., R. N. Nazar and J. Robb. 1993. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42 : 23 - 36.
- Johnston, C. G. and S. D. Aust. 1994. Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7) : 2350 - 2354.
- Picard, C., C. Ponsonnet, E. Paget, X. Nesme and P. Simonet. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2717 - 2722.
- Smalla, K., N. Cresswell, L. C. Mendonca-Hagler, A. Wolters and J. D. van Elsas. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74 : 78 - 85.
- Steffan, R. J. and R. M. Atlas. 1991. Polymerase chain reaction: application in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45 : 137 - 161.
- Tebbe, C. C. and W. Vahjen. 1992. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from Bacteria and a Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8) : 2657 - 2665.
- Tsai, Y.-L. and B. H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 1070 - 1074.
- Tsai, Y.-L. and B. H. Olson. 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2) : 754 - 757.
- Volossiuk, T., E. J. Robb and R. N. Nazar. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11) : 3972 - 3976.
- Waksman, S. A. 1916. Do fungi live and produce mycelium in the soil. *Science* 44 : 320 - 322.
- Warcup, J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166 : 117 - 118.
- Wipat, A., E. M. H. Wellington and V. A. Saunders. 1991. *Streptomyces* marker plasmids for monitoring survival and spread of Streptomycetes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(11) : 3322 - 3330.