

ความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในพื้นที่พรุจังหวัดนราธิวาส

ศวพร ศุภผล*, กรรณิการ์ สัจจาพันธ์*, พทยากร ลิ้มทอง** และสุชาดา โภชาดม

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองฯ สำนักงานพัฒนาที่ดินเขต 12 กรมพัฒนาที่ดิน จังหวัดสงขลา

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ในพื้นที่พรุจังหวัดนราธิวาส ดำเนินการในปี พ.ศ. 2554 โดยเก็บตัวอย่างดินอินทรีย์บริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 8 จุด ดังนี้ จุดที่ 1 ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่ บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 2 ดินบริเวณราก ต้นตังหนใบใหญ่หน้าหอคอย บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 3 ดินบริเวณรากต้นมะฮัง เล็ก บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 4 ดินกลางพรุโต๊ะแดง บริเวณราก จุดที่ 5 ดิน กลางพรุโต๊ะแดง ลึก 0-20 เซนติเมตร จุดที่ 6 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 20-50 เซนติเมตร จุดที่ 7 ดินกลางพรุ โต๊ะแดง ลึก 50-70 เซนติเมตร และจุดที่ 8 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 70-100 เซนติเมตร นำตัวอย่างที่ได้ไปสกัด ดีเอ็นเอ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ 16S rDNA และโคลนขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของ แบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR คัดเลือก Operational taxonomic unit (OTU) ที่แตกต่างในแต่ละตัวอย่างดินไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่า ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ดินทั้ง 8 จุด มี OTU ของจุลินทรีย์ในดินบริเวณรากต้นไม่มีความหลากหลายมากกว่าจุลินทรีย์ในดินพรุโต๊ะแดง เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากล พบว่า บริเวณ 16S rDNA ที่มาจากจุลินทรีย์จาก ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่ 1E-21 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium persicinum* 002-165 (97%) และ E-79 มีความเหมือนกับ *Escherichia fergusonii* ATCC 35496 (97%) ส่วนตัวอย่างดินบริเวณรากต้น ตังหนใบใหญ่หน้าหอคอย พบว่า 2E-1, 2E-7, 2E-14, 2E-20, และ 2E-36 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11 (96-98%) และตัวอย่างดินบริเวณรากต้นมะฮังเล็ก พบว่า 3E- 5 มีความเหมือนกับ *Shigella sonnei* CECT 4887 (97%) ผลการระบุชนิดแบคทีเรียของ OTU ในตัวอย่าง ดิน พบว่า ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากที่สุดและพบ OTU ที่มีความ เหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* ในทุกตัวอย่างดิน *Methylobacterium* spp. แบคทีเรีย สกุลนี้เป็น aerobic facultive methylotropical bacteria การพบแบคทีเรียสกุลนี้ในตัวอย่างดินทั้ง 3 จุด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุลนี้เป็น dominant species

คำสำคัญ: จุลินทรีย์ พื้นที่พรุ

* ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษดินและน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

หลักการและเหตุผล

จากการที่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จติดตามผลการดำเนินงานโครงการการศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ ในพื้นที่ดินเปรี้ยวจัดที่คัดแยกได้จากแปลงโครงการแก่งดินเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปลูกข้าวและข้าวโพดหวานภายในแปลงศึกษาทดลอง วิจัย ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองฯ เมื่อวันที่ 13 มกราคม 2554 พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากแปลงแก่งดิน มีจุลินทรีย์บางชนิดมีประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสและมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส แต่ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์มีความหลากหลายไม่มากนัก จึงทรงมีพระราชดำริ กับเลขาธิการสำนักงาน กปร. ผู้อำนวยการศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองฯ และผู้ทรงคุณวุฒิ ความว่า “...ควรทำเป็นการศึกษาจุลินทรีย์ในพื้นที่ดินพรุ ในพื้นที่ที่ยังไม่ถูกทำลาย เพื่อหาชนิดของจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ...” ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองฯ จึงดำเนินการสนองพระราชดำริ โดยทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่พรุ โดยวิธีชีวโมเลกุลโดยไม่เพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อนำข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ที่อาศัยในพื้นที่ดินพรุ มาวิเคราะห์ถึงกิจกรรมของจุลินทรีย์และระบุกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพทางด้านการเกษตร อุตสาหกรรมและด้านการแพทย์ เพื่อการศึกษาต่อยอดและนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

- 1.1 อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างดิน
- 1.2 เครื่องมือในการสกัดดีเอ็นเอ
 - 1) เครื่องเซนตริฟิว (Centrifuge)
 - 2) เครื่อง Thermal Cycler
 - 3) เครื่อง Gel Electrophoresis
- 1.3 สารเคมีที่จำเป็นในการคัดแยกเชื้อการสกัดดีเอ็นเอ

2. วิธีการ

- 2.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินอินทรีย์บริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 8 จุด ดังนี้ จุดที่ 1 ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่ บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 2 ดินบริเวณรากต้นตังหนใบใหญ่ หน้าหอคอย บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 3 ดินบริเวณรากต้นมะฮังเล็ก บริเวณศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จุดที่ 4 ดินกลางพรุโต๊ะแดง บริเวณราก จุดที่ 5 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 0-20 เซนติเมตร จุดที่ 6 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 20-50 เซนติเมตร จุดที่ 7 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 50-70 เซนติเมตร และจุดที่ 8 ดอนกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 70-100 เซนติเมตร

2.2 การศึกษาความหลากหลายและระบุชนิดของจุลินทรีย์ด้วยวิธีชีวโมเลกุลโดยไม่เพาะเลี้ยงเชื้อ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยวิธีของ Zhou และคณะ (1996) และนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (spectrophotometer method) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นนำค่า A_{260} และ A_{280} มาคำนวณหาปริมาณ ($A_{260} = 1.0 = 50$ ไมโครกรัมของดีเอ็นเอสายคู่/มิลลิลิตร) และหาความบริสุทธิ์ (A_{260} และ A_{280}) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ EUB27 (5'-ATTGGATCCGTTTGAGC(A/C)TGGCTGAG-3') เป็น forward primer และ 1392RH (5'-CGGAAG CTTACGGGCGGTGTGT(A/G)C-3') เป็น reversed primer ด้วยเทคนิค PCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR เข้ากับเวกเตอร์ pGEM- Teasy vector และชักนำรีคอมบีแนนต์พลาสมิดที่เกิดขึ้นเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* JM109 ตรวจสอบรูปแบบของส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ที่สอดแทรกอยู่โดยการทำ PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* เพื่อดูรูปแบบที่เกิดขึ้น จากนั้นคัดเลือก Operational taxonomic unit (OTU) ที่แตกต่างในแต่ละตัวอย่างดินไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA และเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide Blast (Altschul et al, 1997) เพื่อระบุชนิดและสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากการนำตัวอย่างดินจากบริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส มาสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินด้วยวิธีของ Zhou และคณะ (1996) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพ มีการฉีกขาดน้อย และจะเห็นว่า

ปริมาณของดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากดินที่สกัดได้ลดลงตามระดับความลึก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในดินนั้นมีปริมาณน้อยลงตามลำดับความลึกของดินเช่นกัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA พบว่าดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดด้วยวิธี Zhou และคณะ (1996) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA ได้ทุกตัวอย่างแสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีสารยับยั้งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ปนเปื้อนอยู่ แต่เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีของ Zhou และคณะ (1996) ไปทำให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและสกัดดีเอ็นเอที่อยู่ในอะกาโรสด้วย QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) พบว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้นสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของ 16S rDNA ได้ทุกตัวอย่าง

การโคลนยีนในส่วนของ 16S rDNA จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินจากบริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 8 จุด คือ จุดที่ 1 ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่ จุดที่ 2 บริเวณรากต้นตังหนใบใหญ่หน้าหอคอย จุดที่ 3 ดินบริเวณรากต้นมะฮังเล็ก จุดที่ 4 ดินกลางพรุโต๊ะแดง บริเวณราก จุดที่ 5 ดินกลางพรุโต๊ะแดงลึก 0-20 ซม. จุดที่ 6 ดินกลางพรุโต๊ะแดงลึก 20-50 ซม. จุดที่ 7 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 50-70 ซม. และจุดที่ 8 ดินกลางพรุโต๊ะแดง ลึก 70-100 ซม. ได้โคลนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบสที่ได้จากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณในส่วนของ 16S rDNA ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่สกัดตามวิธีของ Zhou และคณะ (1996) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-Teasy และ RBC ชักนำเข้าสู่ *E.coli* JM109 จากนั้นคัดเลือกพลาสมิดที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด (recombinant plasmid) ซึ่งมีส่วนของ 16S rDNA สอดแทรกอยู่ทั้งสิ้น 339 โคลน และตรวจสอบรูปแบบของส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ที่สอดแทรกอยู่โดยการทำ PCR-RFLP เพื่อดูรูปแบบที่เกิดขึ้นด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* จากรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นพบว่า OTU ของจุลินทรีย์ในดินบริเวณรากต้นไม้ไม่มีความหลากหลายมากกว่าจุลินทรีย์ในดินกลางพรุโต๊ะแดง จากนั้นคัดเลือกรีคอมบิแนนต์ที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินเพื่อนำไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากล ซึ่งขณะนี้สามารถระบุชนิดและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในส่วนของดินบริเวณรากต้นไม้ คือตัวอย่างที่ 1-3 ส่วนตัวอย่างดินกลางพรุโต๊ะแดงอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

2. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์

จากการคัดเลือก OUT แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินนำไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากล พบว่า บริเวณ 16S rDNA ที่มาจากจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่ โดย 1E-2 มีความเหมือน (homology) กับ *Rhodoblastus sphaenicola* RS (91%) 1E-6 มีความเหมือนกับ *Methylosinus trichosporium* OB3b (93%) 1E-20 มีความเหมือนกับ *Acidobacterium capsulatum* ATCC 51196 (81%) ส่วน 1E-10, 1E-23, 1E-24, 1E-30, 1E-37, 1E-40, 1E-46, 1E-48, 1E-65, และ 1E-806 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11 (94.99%) 1E-21 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium persicinum* 002-165 (97%)

ตัวอย่างดินบริเวณรากต้นตังหนใบใหญ่หน้าหอคอย พบว่า 2E-1, 2E-7, 2E-14, 2E-20, และ 2E-36 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11 (96-98%) 2E-19, และ 2E-21 มีความเหมือนกับ *Pirellula staleyi* DSM 6068 (89-87%) 2E-5 มีความเหมือนกับ *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 (96%) และ 2E-13 มีความเหมือนกับ *lamia majanohamensis* NBRC 102561 (89%)

ตัวอย่างดินบริเวณรากต้นมะฮังเล็ก พบว่า 3E-5 มีความเหมือนกับ *Shigella sonnei* CECT 4887 (97%) 3E-16 มีความเหมือนกับ *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 (96%) และ 3E-10, 3E-14, 3E-18, 3E-20, 3E-27, 3E-28, 3E-29 และ 3E-36 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11 (94-99%)

จากผลการระบุชนิดแบคทีเรียของ OTU ในตัวอย่างดิน พบว่า ดินบริเวณรากต้นมะฮังใหญ่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากที่สุดและพบ OTU ที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* ในทุกตัวอย่างดิน *Methylobacterium* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบมากบนพืชทั้งที่เป็นอปีไฟต์และเอนโดไฟต์ แบคทีเรียสกุลนี้เป็น aerobic facultive methylotropical bacteria ที่ใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 1 อะตอม (มีเทน เมทานอล) หรือมากกว่า 1 อะตอม [อะซิเตท เอทานอล เอทิลลามีน (C_2) ไพรูเวท (C_3) ซัคซิเนท (C_4)] เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน *Methylobacterium* spp. สามารถสร้างสารที่กระตุ้นการเจริญของพืช เช่น ออกซิน ไซโตไคนิน วิตามินบี 12 ซึ่งช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตของราก และการเพิ่มผลผลิตของพืช และยังพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นเอนโดไฟต์ยังกระตุ้นให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้ เช่น *Methylobacterium* sp. IMBG290 กระตุ้นระบบ antioxidant ของมันฝรั่งทำให้ทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Pectobacterium atrosepticum* (Ardanov, 2011) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Methylobacterium* spp. สามารถย่อยสลายสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon เช่น phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]pyrene, benzo[a]anthracene, and 7,12-dimethylbacterium spp. ในตัวอย่างดินทั้ง 3 จุด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุลนี้เป็น dominant species ดังนั้นจึงเป็นโอกาสดีที่จะแยกแบคทีเรียในสกุลนี้จากดินบริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และนำมาทดสอบศักยภาพในด้านต่างๆเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

สรุป

1. การสกัดดีเอ็นเอ วิธีของ Zhou และคณะ (1996) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพ
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR ต้องมีการสกัดด้วยวิธีของ Zhou และคณะ (1996) สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี ให้มีความบริสุทธิ์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสถึงจะสามารถเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

3. การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 8 จุด พบว่า OTU ของจุลินทรีย์ในดินบริเวณรากต้นไม้มีความหลากหลายมากกว่าจุลินทรีย์ในดินกลางพรุโต๊ะแดง

4. การคัดเลือก OUT แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินนำไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากล พบว่า บริเวณ 16S rDNA ที่มาจากจุลินทรีย์จากดินบริเวณรากต้นไม้มะฮังใหญ่ 1E-21 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium persicinum* 002-165 (97%) และ E-79 มีความเหมือนกับ *Escherichia fergusonii* ATCC 35496 (97%) ส่วนตัวอย่างดินบริเวณรากต้นไม้ตงหนใบใหญ่หน้าหอคอย พบว่า 2E-1, 2E-7, 2E-14, 2E-20, และ 2E-36 มีความเหมือนกับ *Methylobacterium aerolatum* 5413S-11 (96-98%) และตัวอย่างดินบริเวณรากต้นไม้มะฮังเล็ก พบว่า 3E-5 มีความเหมือนกับ *Shigella sonnei* CECT 4887 (97%)

5. ผลการระบุชนิดแบคทีเรียของ OTU ในตัวอย่างดิน พบว่า ดินบริเวณรากต้นไม้มะฮังใหญ่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากที่สุดและพบ OTU ที่มีความเหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Methylobacterium* ในทุกตัวอย่างดิน *Methylobacterium* spp. แบคทีเรียสกุลนี้เป็น aerobic facultive methylotropical bacteria การพบแบคทีเรียสกุลนี้ในตัวอย่างดินทั้ง 3 จุด แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในสกุลนี้เป็น dominant species ดังนั้นจึงเป็นโอกาสดีที่จะแยกแบคทีเรียในสกุลนี้จากดินบริเวณพื้นที่พรุ จังหวัดนราธิวาส

เอกสารอ้างอิง

- Ardanov, P., Ovcharenko L., Zaets I., Kozyrovska N., Pirttilä AM (2011) Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). Biol Control 56: 43–49.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25, 3389–3402
- QIAGEN. 2001. QIAGEN PCR Cloning Handbook. Available source: www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=2062 -, November 12, 2008.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–25.
- Zhou, J., M.A. Bruns and M.T. James. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. Am. Soc. Microbiol. 62: 316–322.