

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК З ҐРУНТУ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ РИЗОСФЕРНИХ МІКРОБІОЦЕНОЗІВ

Проведено порівняльний аналіз різних методів виділення мікробної ДНК з чорнозему звичайного і темно-сірого опідзоленого ґрунту ризосфери сої. Після очистки з використанням високодисперсного оксиду кремнію (AppliChem, Германия) всі препарати ДНК, виділені з темно-сірого опідзоленого ґрунту, були придатні для ампліфікації генів 16S рРНК з універсальними бактеріальними праймерами 11F і 1492R. За екстрагування ДНК з чорнозему звичайного придатні для ПЛР препарати ДНК отримано із застосуванням двох із шести досліджених методів. Виділення ДНК з використанням комерційного набору Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США) дозволило отримати невелику кількість ДНК, придатної для молекулярних досліджень, без процедури додаткової очистки.

Ключові слова: ризосферний ґрунт, мікробна ДНК, мікробіоценоз, полімеразна ланцюгова реакція.

Ґрунтові мікроорганізми відіграють ключову роль у розвитку наземних екосистем, вносять значний вклад у живлення та формування рослин, їх продуктивність, стійкість до дії зовнішніх стресових факторів. Вони беруть безпосередню участь у різноманітних біогеохімічних циклах, відповідають за кругообіг органічних та неорганічних речовин, впливають на структуру та родючість ґрунту [4]. Запорукою екологічної рівноваги у природних ценозах є збереження різноманітності макро- та мікробіоти.

При вивченні мікробної різноманітності ґрунту виникає ряд методичних питань, що потребують оптимізації експериментальних методів. Більшість ґрунтових мікроорганізмів неможливо культивувати в лабораторних умовах (культивується близько 1 % усіх бактерій) через складність підбору оптимальних умов росту [4]. Тому в останні десятиліття застосовують молекулярні методи вивчення різноманітності, які базуються, в першу чергу, на екстракції нуклеїнових кислот мікроорганізмів з ґрунту. Такі підходи дають уявлення про унікальну біорізноманітність мікробних угруповань [5]. Методичні труднощі цих підходів обумовлені тісним зв'язком мікробних клітин з часточками ґрунту, що заважає отриманню ДНК з великою молекулярною масою [3], а також наявністю у ґрунті високомолекулярних органічних сполук (рештки рослинного і тваринного походження, кореневі екsudати). Крім того, разом з ДНК із ґрунту екстрагуються гумінові кислоти, які перешкоджають подальшим молекулярним дослідженням. Вони можуть інгібувати Таq ДНК-полімеразу під час ПЛР [8], заважати розщепленню ДНК рестриктазами [6], знижувати ефективність трансформації при клонуванні [10] та специфічність ДНК-гібридизації [9]. Тому очищення ДНК після прямої екстракції може бути критичною стадією для отримання чистого зразка. Зважаючи на унікальність структури, фізико-хімічних властивостей та біохімічного складу ґрунтів різного генезису, необхідно підбирати методи виділення сумарної мікробної ДНК для кожного з них.

Метою нашої роботи було підібрати ефективний та простий метод виділення сумарної ДНК мікроорганізмів із зразків ризосферного ґрунту рослин сої, яку у подальшому можна використовувати для ПЛР-ампліфікації та інших молекулярних досліджень.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктами дослідження були чорнозем звичайний та темно-сірий опідзолений ґрунт ризосфери сої сортів Аннушка та Юг 30, відібрані на дослідних полях ННЦ «Інститут землеробства НААН» (смт Чабани, Київська обл.). ДНК виділяли з ризосферного ґрунту сої, насіння якої не було оброблене хімічними та біологічними препаратами. Зразки ризосферного ґрунту відбирали в кінці вегетаційного періоду, просівали через 2 мм сито та зберігали при температурі -20°C.

У роботі проводили порівняння 6 методів, які, за літературними даними, використовуються при виділенні мікробної ДНК з різних екониш.

Метод 1 з використанням протеїнази K (AppliChem, Германия) і додецилсульфату натрію (англ. sodium dodecyl sulfate, SDS) [12]. Ґрунт (0,5 г) був суспендований у 1,5 мл лізуючого буфера (100 мМ Tris-HCl, 100 мМ K₂HPO₄, 100 мМ Na-EDTA, 1% [m/V] CTAB, 1,5 М NaCl, pH 8,0) з додаванням розчину протеїнази K з концентрацією 10 мг/мл. Суспензію інтенсивно перемішували на горизонтальному струшувачі при кімнатній температурі, додавали 20 % розчин SDS і витримували 2 год у рідинному термостаті при температурі 65 °С з легким перемішуванням кожні 15-20 хв. Осад відділяли центрифугуванням. У подальшій роботі використовували супернатант, який очищали додаванням рівного об'єму суміші фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт (25:24:1). Водну фазу відбирали після центрифугування. ДНК, яка містилась у розчині, осаджували ізопропанолом при 4°С протягом ночі. Осад збирали центрифугуванням і промивали охолодженим до 4°С 70 % етанолом, висушували на повітрі, розчиняли у деіонізованій (MQ) воді, доводячи об'єм до 50 мкл. Екстраговану ДНК зберігали при -20°С.

Метод 2 з використанням 2% цетил-триметил амонію броміду (англ. cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), AppliChem, Германия) [12]. Ґрунт (0,5 г) суспендували у 1,5 мл буфера (100 мМ Tris-HCl, 100 мМ K₂HPO₄, 100 мМ Na-EDTA, 2 % [m/V] CTAB, 1,5 М NaCl, pH 8,0) з додаванням 20 % розчину SDS. Подальші процедури очистки та виділення ДНК були такими ж, як і в методі 1.

Метод 3 із застосуванням заморожування-відтаювання [12]. Ґрунт (0,5 г) змішували з 1,5 мл буфера (100 мМ Tris-HCl, 100 мМ K₂HPO₄, 100 мМ Na-EDTA, 1 % [m/V] CTAB, 1,5 М NaCl, pH 8,0), потім зразки заморожували у рідкому азоті протягом 10 хв і розігрівали у рідинному термостаті до температури 65°С. Таку процедуру повторювали 3 рази. Після додавання до зразків 20 % розчину SDS подальші процедури виділення ДНК були такими ж, як і в методі 1.

Метод 4 з використанням TENC-буфера [7]. Наважку ґрунту (0,5 г) змішували з 1,5 мл TENC-буфера (100 мМ Tris -HCl, 10 мМ Na-EDTA, 100 мМ NaCl, 1 % [m/V] CTAB, протеїназа K (50 мкг/мл), pH 8,0), заморожували у рідкому азоті (10 хв) і розігрівали до температури 56°С. Після цього додавали 20 % розчин SDS і далі ДНК виділяли і очищали, як у методі 1.

Метод 5 з подрібненням в рідкому азоті [11]. Наважку ґрунту (0,5 г) заморожували в рідкому азоті, подрібнювали у ступці та суспендували в 1 мл буфера наступного складу: 0,3 % SDS в 0,14 М NaCl, 50 мМ ацетат натрію, pH 5,1. Зразки очищали додаванням рівного об'єму насиченого водного розчину фенолу. ДНК осаджували за допомогою етанолу при -20°С, промивали охолодженим до 4°С 70 % етанолом, висушували на повітрі і розчиняли у деіонізованій воді. ДНК зберігали при -20°С.

Метод 6 – із застосуванням комерційного набору Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США). Тотальну ДНК ґрунту виділяли за рекомендаціями виробника.

Кількість ДНК у зразках ґрунту оцінювали методом спектрофотометрії за допомогою приладу NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Метод визначення концентрації нуклеїнових кислот у розчині заснований на існуванні у ДНК і РНК максимуму поглинання при довжині хвилі 260 нм.

Показники кількості виділеної ДНК представлені у перерахунку на 1 г абсолютно сухого ґрунту (АСГ), який отримували висушуванням зразків ґрунту за температури 105°С до постійної маси.

Ступінь чистоти ДНК визначали за відношеннями поглинання при довжинах хвиль A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} .

Для детекції ДНК у зразках використовували метод електрофорезу в 1 % агарозному гелі в однократному тріс-боратному буфері (ТВЕ), який містив бромистий етидій у концентрації 0,5 мкг/мл при напрузі електричного поля 6 Вт/см.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для ампліфікації генів 16S рРНК з універсальними бактеріальними праймерами 11F (5' GTTGTGATCMTGGCTCAG 3') і 1492R (5' TACGGYTACSTTGTACGACTT 3'), де М = С або А, Y = С або Т, проводили з використанням комерційного набору для ПЛР (Fermentas, Литва). Отримання полімеразних копій гена (приблизно 1500 п.н.) проводили на приладі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). Ампліфікацію проводили у 20 мкл реакційної суміші наступного складу: буфер ДНК полімерази, 2 мМ MgCl₂, по 6 нМ кожного із чотирьох dNTP, по 6,25 пМ прямого і зворотного

праймерів і 1,5 од. ДНК-полімерази. Використовували такий температурно-часовий профіль: перший цикл - 94°C 5 хв, 50°C 30 с, і 72°C 1 хв; наступні 25 циклів: 94°C 30 с, 50°C 30 с, і 72°C 1 хв, кінцева полімеризація при 72°C 4 хв. Аналіз продуктів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі в однократному ТВЕ-буфері, який містив бромистий етидій, при напрузі поля 6 Вт/см.

Результати та їх обговорення. Концентрація і ступінь чистоти препаратів виділеної ДНК залежать від типу ґрунту і кількості та складу наявних органічних сполук. Наприклад, виділення сумарної мікробної ДНК із активного мулу чи водойми вимагає незначної очистки, у той час як виділення ДНК із ґрунту ускладнене присутністю широкого спектру органічних речовин та органічних решток. Крім того, більшість ґрунтів містить ксенобіотики, які дуже складно видалити [2].

Для отримання препаратів ДНК з ризосферного ґрунту нами застосовано 6 методів, що базуються на прямому лізисі бактеріальних клітин (без попередньої ізоляції бактеріальних клітин з ґрунту) з подальшим виділенням ДНК. Для лізису бактеріальних клітин використовували SDS. У методах 1 і 4 до лізуючого буфера додавали протеїназу К для кращого розщеплення і відділення білків від нуклеїнових кислот. Як відомо, ґрунти містять велику кількість гетерогенних за своїм складом гумусових компонентів, найважливішими серед яких є гумінові кислоти. Щоб їх позбутися, у методах 1, 2, 3 і 4 застосовували СТАВ, який сприяє кращому відділенню органічних домішок від нуклеїнових кислот і більшому виходу ДНК.

Кількісні (концентрація) і якісні (відношення A_{260}/A_{280} і A_{260}/A_{230}) характеристики препаратів ДНК, виділених різними методами із двох типів ґрунту, представлені у таблиці. Відомо, що співвідношення максимумів поглинання при довжинах хвиль 260 нм і 280 нм (A_{260}/A_{280}) характеризує чистоту препарату ДНК, який вважається чистим, якщо відношення наближається до 1,8. У разі менших значень цього співвідношення препарат містить домішки білка, ароматичних сполук або інших контамінуючих агентів, що мають максимуми поглинання при 280 нм. Другим показником чистоти препарату ДНК є співвідношення значень поглинання при довжинах хвиль 260 нм і 230 нм (A_{260}/A_{230}), яке у разі чистого препарату зазвичай дорівнює 1,8 – 2,2 [1]. Менші значення цього показника свідчать про забруднення препарату компонентами, які залишаються після процедури виділення ДНК.

Таблиця

Характеристика препаратів ДНК, виділених із ризосферного ґрунту сої

| № п/п | Метод виділення ДНК | Кількість ДНК, мкг/г АСГ | Співвідношення | |
|-------------------------------|---|--------------------------|-------------------|-------------------|
| | | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| Темно-сірий опідзолений ґрунт | | | | |
| 1 | Використання протеїнази К і SDS [12] | 24,1±6,6 | 1,40 | 0,85 |
| 2 | Використання СТАВ [12] | 43,3±1,1 | 1,38 | 0,81 |
| 3 | Застосування заморожування-відтаювання [12] | 22,2±2,5 | 1,41 | 0,85 |
| 4 | Використання ТЕНС-буфера [7] | 17,9±2,1 | 1,54 | 1,26 |
| 5 | Подрібнення в рідкому азоті [11] | 21,6±0,5 | 1,40 | 0,77 |
| 6 | Power Soil DNA Isolation Kit | 3,3±0,1 | 2,09 | 0,21 |
| Чорнозем звичайний | | | | |
| 1 | Використання протеїнази К і SDS [12] | 37,5±1,5 | 1,40 | 0,77 |
| 2 | Використання СТАВ [12] | 48,2±1,9 | 1,38 | 0,73 |
| 3 | Застосування заморожування-відтаювання [12] | 140,7±5,6 | 1,35 | 0,74 |
| 4 | Використання ТЕНС-буфера [7] | 8,6±0,3 | 1,45 | 0,85 |
| 5 | Подрібнення в рідкому азоті [11] | 74,1±2,9 | 1,41 | 0,73 |
| 6 | Power Soil DNA Isolation Kit | 3,8±0,1 | 2,07 | 0,36 |

*АСГ – абсолютно сухий ґрунт.

Порівняння результатів, отриманих при виділенні ДНК з чорнозему звичайного, показало, що не всі використані методи забезпечують високий вихід продукту і отримання чистих препаратів ДНК. Як видно з таблиці, найбільша кількість ДНК була отримана при виділенні за допомогою методу 3 (заморожування-відтаювання), але вона була невисокої якості – співвідношення A_{260}/A_{280} становило 1,35.

Вихід ДНК при використанні СТАВ-методу (2), методу виділення за допомогою протеїнази К і SDS (1) та подрібнення в рідкому азоті (5) був відповідно у 2,9, 3,8 і 1,9 рази меншим, ніж у варіанті із застосуванням методу заморожування-відтаювання (3). Препарати ДНК, отримані цими методами, були вищої якості: співвідношення A_{260}/A_{280} було 1,38, 1,4 та 1,41 відповідно. Ще меншу кількість препарату отримали при використанні методів виділення на основі TENC-буфера та за допомогою Power Soil DNA Isolation Kit (М ВІО, США) – 8,6 та 3,8 мкг/г АСГ відповідно. Проте, не дивлячись на малу кількість, ДНК, отримана цими методами, була вищої якості: співвідношення A_{260}/A_{280} становило 1,45 та 2,07 відповідно.

Слід зазначити, що співвідношення A_{260}/A_{230} , за яким оцінюють ступінь забруднення препаратів ДНК іншими органічними сполуками (напр. гуміновими кислотами тощо) при використанні всіх 6 методів були низькими – від 0,36 (за використання Power Soil DNA Isolation Kit) до 0,85 (за виділення ДНК із застосуванням TENC-буфера).

При співставленні результатів, отриманих при виділенні ДНК з темно-сірого опідзоленого ґрунту, встановлено, що використані методи 1, 2, 3 і 5 давали майже однаковий вихід препарату ДНК – від 21,6 до 43,3 мкг/г АСГ з низькою якістю: співвідношення A_{260}/A_{280} дорівнювало 1,38-1,41, а співвідношення A_{260}/A_{230} коливалося від 0,77 (метод 5) до 0,85 (метод 1 і 3). При виділенні ДНК за допомогою Power Soil DNA Isolation Kit (метод 6) кількість ДНК була 3,3 мкг/г АСГ, проте співвідношення A_{260}/A_{280} становило 2,09, а A_{260}/A_{230} лише 0,21. Це може свідчити про забруднення препарату небажаними органічними домішками.

Присутність ДНК у зразках перевіряли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі (рис. 1).

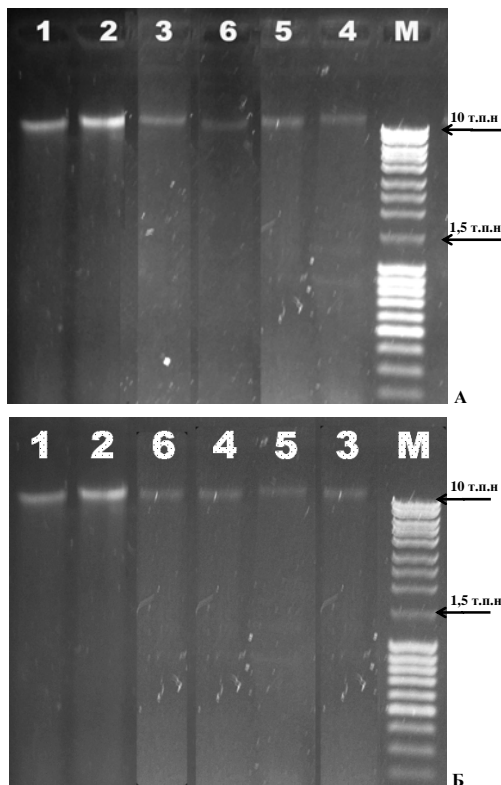


Рис. 1. Гель-електрофорез мікробної ДНК, екстрагованої з ґрунту ризосфери сої різними методами (А – чорнозем звичайний, Б – темно-сірий опідзолений ґрунт)

1 – ДНК, виділена методом 1 (з використанням протеїнази К і SDS). 2 – ДНК, виділена методом 2 (з використанням 2% СТАВ); 3 – ДНК, виділена методом 3 (з використанням прийому заморожування-відтаювання); 4 – ДНК, виділена методом 4 (з використанням TENC-буфера); 5 – ДНК, виділена методом 5 (із застосуванням подрібнення в рідкому азоті); 6 – ДНК, виділена методом 6 (з використанням Power Soil DNA Isolation Kit); М – маркер молекулярної маси (Fermentas, Литва).

На наступному етапі досліджень отримані методами 1–5 препарати ДНК очищали з використанням високодисперсного оксиду кремнію (AppliChem, Германия). Після цього була проведена полімеразна ланцюгова реакція на ДНК, отриманій всіма дослідженими методами, з використанням універсальних бактеріальних праймерів — 11F та 1492R, комплементарних до фрагмента гена 16S рРНК (1500 п.н.).

Присутність у зразках продуктів ПЛР підтверджували електрофорезом в 1 % агарозному гелі (рис. 2).

Показано, що після очистки ДНК, виділеної з темно-сірого опідзоленого ґрунту усіма досліджуваними методами, полімеразна ланцюгова реакція була успішною, а на ДНК, виділеній з чорнозему звичайного, ампліфікати було отримано у варіантах з використанням методів 1 (із застосуванням протеїнази К та SDS) і 4 (з використанням TENC-буферу).

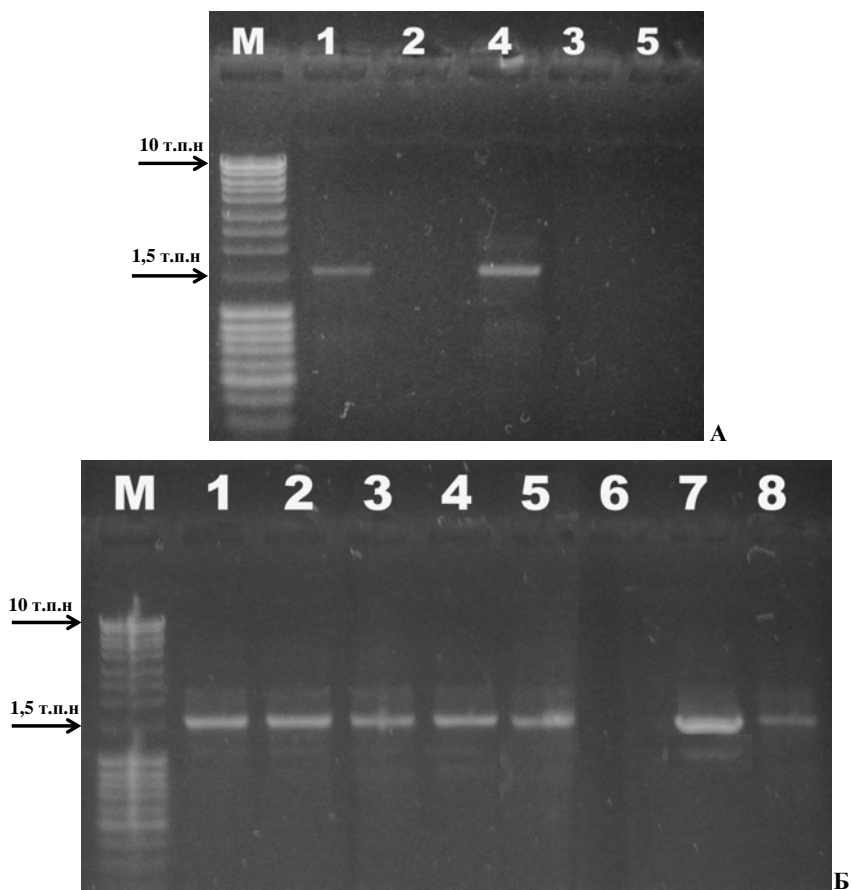


Рис. 2. Гель-електрофорез ампліфікатів генів 16S рРНК, отриманих за ПЛР з універсальними бактеріальними праймерами 11F і 1492R (А – чорнозем звичайний, Б – темно-сірий опідзолений ґрунт)

1 – ДНК, виділена методом 1 (з використанням протеїнази К і SDS); 2 – ДНК виділена методом 2 (з використанням СТАВ); 3 – ДНК, виділена методом 3 (з використанням прийому заморожування-відтаювання); 4 – ДНК, виділена методом 4 (з використанням TENC-буфера); 5 – ДНК, виділена методом 5 (із застосуванням подрібнення в рідкому азоті); 6 – негативний контроль (без ДНК); 7 – ДНК, виділена методом 6 (з використанням Power Soil DNA Isolation Kit); 8 – позитивний контроль (ДНК *Bradyrhizobium japonicum*); М – маркер молекулярної маси (Fermentas, Литва).

Таким чином, порівняльний аналіз різних методів екстракції тотальної ДНК з ґрунту показав, що після очистки з використанням високодисперсного оксиду кремнію всі препарати, виділені з темно-сірого опідзоленого ґрунту, були придатні для ПЛР. За екстрагування ДНК з чорнозему звичайного лише 2 із 6 досліджених методів дали змогу отримати такі препарати.

Виділення ДНК ґрунту з використанням Power Soil DNA Isolation Kit дозволило отримати придатні для молекулярних досліджень препарати без процедури додаткової очистки.

С.В. Вознюк, Л.В. Титова, Г.О. Иутинская

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д 03680, Украина*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ПОЧВЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ

Резюме

Проведен сравнительный анализ разных методов выделения микробной ДНК из чернозема обыкновенного и темно-серой оподзоленной почвы ризосферы сои. После очистки с использованием высокодисперсной окиси кремния (AppliChem, Германия) все препараты ДНК, выделенные из темно-серой оподзоленной почвы, были пригодны для амплификации генов 16S рРНК с универсальными бактериальными праймерами 11F і 1492R. При экстракции ДНК из чернозема обыкновенного пригодные для ПЦР препараты ДНК получены при использовании двух из шести исследованных методов. Выделение ДНК с применением коммерческого набора Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США) позволило получить небольшое количество ДНК, пригодной для молекулярных исследований, без процедуры дополнительной очистки.

Ключевые слова: ризосферная почва, микробная ДНК, микробиоценоз, полимеразная цепная реакция.

S.V. Vozniuk, L.V. Tytova, G.O. Iutynska

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine*

COMPARATIVE ANALYSIS OF ISOLATION METHODS OF DNA FROM RHIZOSPHERE SOIL FOR RESEARCH OF MICROBIOCENOSIS

Summary

The comparative analysis of different methods for the isolation of microbial DNA from ordinary black earth and dark-gray podzolic soil of soybean rhizosphere was carried out. All preparations of DNA which isolated from dark-gray podzolic soil after purification using highly dispersed silica (AppliChem, Germany) were suitable for 16S rRNA genes amplification with universal bacterial primers 11F і 1492R. For DNA extraction from ordinary black earth suitable for PCR DNA preparations were obtained using two of the six investigated methods. Isolation of DNA using a commercial Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, USA) can get a small amount of DNA suitable for molecular studies without further purification procedures.

Key words: rhizospheric soil, microbial DNA, microbiocenosis, polymerase chain reaction.

The author's address: Vozniuk S.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine; phone number 0976826097.

1. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: учебник для вузов. – М.: Издательство Московского университета, 2012. – 480 с.
2. Запороженко Е.В., Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кравченко И.К., Кузнецов Б.Б. Экспресс-метод выделения ДНК из бактериальных сообществ различных почв // Микробиология. – 2006. – Т. 75, №1. – С. 127 – 134.
3. Jizhong Z., Bruns M. and Tiedje J.M. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition // Applied and

- environmental microbiology. – 1996. – V. 62, № 2. – P. 316–322.
4. Kirk J.L., Beaudette Lee A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Hung L., Trevors.J.T. Methods of studying soil microbial diversity // *Journal of Microbiological Methods*. – 2004. – V. 58. – P. 169–188.
 5. Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G. and Catroux G. DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67, № 5. – P. 2354–2359.
 6. Porteous L. A. and Armstrong J. L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method // *Curr. Microbiol.* – 1991. – V. 22. – P. 345–348.
 7. Roh C. H., Villatte F., Kim B. G., Schmidt R. D. “In-gel patch electrophoresis:” A new method for environmental DNA purification // *Electrophoresis*. – 2005. – V. 26. – P. 3055–3061.
 8. Smalla K., Cresswell N., Mendonca-Hagler L. C., Wolters A. and Van Elsas J. D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification // *J. Appl. Bacteriol.* – 1993. – V. 74. – P. 78–85.
 9. Steffan R. J. and Atlas R. M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – V. 54. – P. 2185–2191.
 10. Tebbe C. C. and Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59. – P. 2657–2665.
 11. Volossiuk T., Robb E. J. and Ross N. N. Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms // *Applied and environmental microbiology*. – 1995. – V. 61, № 11. – P. 3972–3976.
 12. Xia J., Shi-jie H., Yong-hua Z., Yu-mei Z. Comparisons of extraction and purification methods of soil microorganism DNA from rhizosphere soil // *Journal of Forestry Research*. – 2006. – V. 17, №1. – P. 31–34.

Отримано 26.09.2013