

Weed & Turfgrass Science was renamed from both formerly Korean Journal of Weed Science from Volume 32 (3), 2012, and formerly Korean Journal of Turfgrass Science from Volume 25 (1), 2011 and Asian Journal of Turfgrass Science from Volume 26 (2), 2012 which were launched by The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea founded in 1981 and 1987, respectively.

## 갈색퍼짐병 발병토양의 미생물 군집 분석

이정환<sup>1</sup> · 민규영<sup>2</sup> · 전창욱<sup>3</sup> · 최수민<sup>4</sup> · 한정지<sup>4</sup> · 심규열<sup>1</sup> · 곽연식<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>한국잔디연구소, <sup>2</sup>대정골프엔지니어링, <sup>3</sup>경상대학교 식물외과, <sup>4</sup>국립산림과학원

### Soil Microbial Community Analysis in Large Patch (*Rhizoctonia solani* AG2-2 IV)

Jung Han Lee<sup>1</sup>, Gyu Young Min<sup>2</sup>, Gyu Yul Shim<sup>1</sup>, Chang Wook Jeon<sup>3</sup>,

Su min Choi<sup>4</sup>, Jeong Ji Han<sup>4</sup>, and Youn-Sig Kwak<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Turfgrass Research Institute, Seongnam 463-840, Korea

<sup>2</sup>Daejung Golf Engineering Co. Ltd., Yongin 449-881, Korea

<sup>3</sup>Department of Plant Medicine and Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>4</sup>Southern Forest Resource Research Center, Korea Forest Research Institute, Jinju, Gyeongnam 660-300, Korea

**ABSTRACT.** Large patch, caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 IV, is a soil-born disease that is the most important of warm season turfgrass such as zoysia and Bermuda grass. This study was conducted to analysis of the soil microbial community structure on large patch. Center of the large patch (CLC), edge (CLE) and healthy (CLH) part of microbial communities were examined using metagenomics in Phylum level. Distribution trends of the rhizosphere microorganisms were similar to the order Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Cyanobacteria and Verrucomicrobia in soil collections. Contrastively Actinobacteria was more 56% abundant in healthy part soil (16%) than in the center (9.28%) or edge (10.84%) parts. Taxonomic distributions were compared among the CLC, CLE and CLH, total 6,948 OTUs were detected in the CLC, 6,505 OTUs for the CLE and 5,537 OTUs were detected in the CLE. Distributions of Actinobacteria OTUs were appeared 615 OTUs in the CLC, 709 OTUs in the CLE and 891 OTUs in the CLH. Among Actinobacteria, 382 OTUs were overlapped in the all soils. Not matched OTUs of CLH (286 OTUs) was detected 23 times higher than CLC (91 OTUs) and CLE (126 OTUs).

**Key words:** Large Patch, Metagenomics, *Rhizoctonia solani*, Zoysiagrass

Received on March 30, 2015; Revised on May 18, 2015; Accepted on May 26, 2015

\*Corresponding author: Phone) +82-55-772-1922, Fax) +82-55-772-1929; E-mail) kwak@gnu.ac.kr

© 2015 The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

Metagenomics를 이용한 미생물상 분석법은, 다양한 토양 미생물의 대량 분석을 가능하게 했을 뿐 아니라, 배양이 불가능한 미생물의 분포 조사에 이용되고 있다(Amann et al., 1995). 현재 사용되고 있는 미생물 분류 및 동정 방법은 생화학적인 방법으로 미생물의 특성을 검정하거나 rRNA의 염기서열을 분석하는 분자생물학적 방법으로 이루어지고 있다(Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990). 이는 순수배양 할 수 있는 미생물을 대상으로 하는 방법으로 배양되지

않거나 특수한 조건에서만 배양되는 미생물을 연구하는 데는 제한적이라 할 수 있다. 약 6,400~38,000 종의 미생물이 1 g의 토양에 존재한다는 보고가 있으나 배지상에 배양이 가능한 균은 1~2%인 것으로 알려져 있다(Curtis et al., 2002; Amann et al., 1995).

Metagenomics는 특정 환경에 존재하는 미생물의 유전체 집합 연구하는 학문으로 알려져 있다(Handelsman et al., 1998). 또한 Metagenomics는 생태학을 비롯하여 극한환경, 식품, 의학, 미생물의 공생, 바이오 연료, 자원 발굴, 생명 공학과 농업 등 다양한 분야에서 활용되고 있다(Qin et al.,

2010; Jung et al., 2011; Mackelprang et al., 2011). 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing)은 토양 샘플에서 분리된 전체 미생물의 방대한 양의 DNA를 정리하고 분석할 수 있는 강력한 도구로 이로 인하여 환경미생물학의 발전 가능성이 증가되었다(Edwards et al., 2006). 직접 미생물을 배양하는 방법은 토양 미생물의 다양성을 평가하는데 사용될 수 있으나 토양 미생물의 작은 부분만을 확인할 수 있는 방법이다(Torsvik et al., 1996). 이러한 단점을 극복하기 Metagenomics를 이용한 새로운 접근 방식이 활용되고 있다(Daniel, 2005; Handelsman, 2004). 이에 반해 잔디에 발생하는 병에 대하여 Metagenomics를 이용하여 조사한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 Metagenomics 연구방법을 활용하여 조이시아(Zoysia) 잔디의 가장 중요한 병으로 인식되고 있는 갈색퍼짐병이 발생한 곳과 병이 발생하지 않은 부분 그리고 경계지점의 근권부 토양의 미생물 군집을 조사하였다. 또한 Pyrosequencing으로 얻은 Operational Taxonomic Units (OTUs)을 분석하여 다각적인 측면에서 자료를 분석하고 친환경 생물적 방제 인자를 선별하는 근거로 이용하기 위하여 시험되었다.

## 재료 및 방법

### 토양 DNA 추출, PCR 조건 및 pyrosequencing

2013년 9월에 국내 잔디 재배지인 장성군 일대의 포장에서 발생한 갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 병이 발생하지 않은 건전부(CLH)의 근권(rhizosphere) 토양을 수집하여 DNA를 추출하였다(Fig. 1). 근권 토양을 홀커터를 이용하여 잔디와 함께 토양을 덜어내고 뿌리가 없는 토양층을 잘라낸 후 토양을 터는 방법으로 수집하였다. 실험의 신뢰성을 높이기 위하여 5군데의 갈색퍼짐병이 발생한 근권부 토양을 채취하여 혼합하여 사용하였다. FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)를 이용하여 제



**Fig. 1.** Symptom of a typical large patch and representative collection points of rhizosphere soils for DNA extraction on September. A: Center of large patch (CLC); B: edge of large patch (CLE); C: Health plant (CLH).

조사가 제공하는 매뉴얼에 따라 토양 DNA를 추출하였다. 근권 토양으로부터 분리된 DNA는 16S rRNA 유전자의 V1-V3 부분을 증폭하는 Forward primer 27F primer 와 revers primer로 518R를 이용하여 증폭하였다(Lane, 1991; Muyzer et al., 1996). PCR 조건은 다음과 같이 수행하였다. 최초 94°C에서 5분간 변성반응(initial denaturation)을 하였으며 94°C에서 30초간 변성반응(denaturation), 60°C에서 30초간 중합반응(annealing), 72°C에서 1분 20초간 신장반응(extension)을 25회 반복한 후 마지막으로 72에서 8분간 신장반응을 수행하였다. pyrosequencing은 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche, Mannheim, German)을 이용하여 Chunlab Incorporation (Seoul, Korea)에서 의뢰하여 수행하였다.

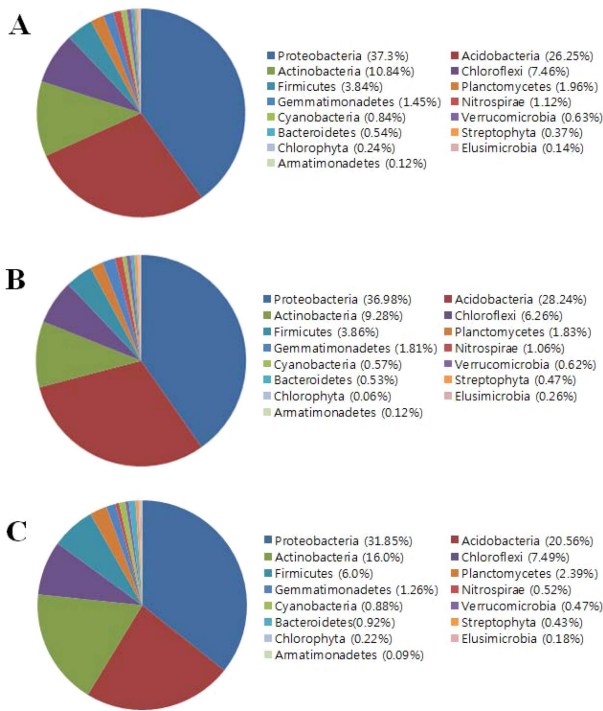
### Metagenomic 데이터 분석

갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)에서 채취한 근권부 토양의 미생물 군집(bacterial composition)을 조사하기 위하여 Bray Curtis similarity (ANOSIM) 평가를 하였으며 각 샘플간의 유의차를 분석하였다. 군집 분석은 PRIMER v6를 이용하여 도식화하였다(Bray and Curtis, 1957; Clarke and Gorley, 2006). 염기서열 유사성을 기준으로 분류가 가능한 pyrosequencing으로부터 얻은 Operational Taxonomic Units (OTUs)을 분석하였으며, 패취의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)에서 미생물군집을 과(Family) 수준에서 클러스팅 분류를 하였다. Family의 종류로는 Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Nitrospirae, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Bacteroidetes와 Cyanobactria의 11종류였다.

## 결과 및 고찰

### 근권부토양의 미생물 분포

갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)에서 채취한 근권부 토양의 미생물 군집(bacterial composition)을 Metagenomics 데이터 분석으로 Phylum 수준에서 조사한 결과 중심부, 가장자리와 건전부에서 미생물상은 Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Cyanobactria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes 등의 순으로 분포 경향은 모두 유사하게 나타났다. 중심부(CLC)의 경우 Proteobacteria (36.98%)와 Acidobacteria (28.24%)가 대부분을 차지하였으며 다음으로 Actinobacteria (9.28%), Chloroflexi (6.26%), Firmicutes (3.86%), Planctomycetes (1.83%), Gemmatimonadetes (1.81%)와 Nitrospirae (1.06%) 순으로 나타났다. 가장자리(CLE)에서 Metagenomics 데이터 분



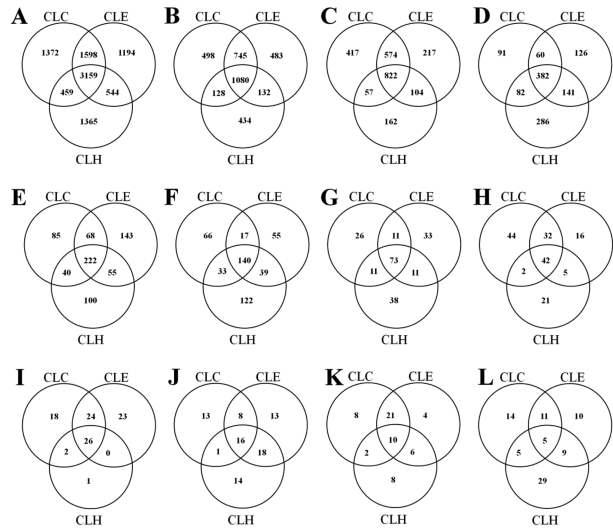
**Fig. 2.** Composition of microbial communities in the rhizosphere on September. A: center of the large patch (CLC); B: edge of the large patch (CLE); C: Healthy (CLH).

석결과 Proteobacteria (37.30%)와 Acidobacteria (26.25%)가 중심부 결과와 같이 대부분을 차지하였으며 다음으로 Actinobacteria (10.84%), Chloroflexi (7.46%), Firmicutes (3.8%), Planctomycetes (1.96%), Gemmatimonadetes(1.45%)와 Nitrospirae (1.12%) 순으로 나타났다(Fig. 2B). 건전부(CLH)의 결과는 Proteobacteria와 Acidobacteria가 각각 31.85와 20.56%로 중심부와 가장자리에서 도출된 결과보다 다소 낮게 나타났으나, Actinobacteria의 경우 중심부에서 9.28%로 가장자리에서 10.84% 인데 비하여 건전부에서는 16%로 56% 정도 높은 비율로 분포하는 결과가 나타났다. 다음으로 Chloroflexi (7.49%), Firmicutes (6.0%), Planctomycetes (2.39%), Gemmatimonadetes (1.26%)와 Nitrospirae (0.52%) 순으로 분포하였다(Fig. 2C).

식물이 뿌리를 통해 분비하는 물질(root exudates)로 인하여 근권(rhizosphere) 토양의 화학성분을 변화시켜 토양 미생물의 군집을 변화시킨다고 보고되어있다(De Leij et al., 1993). 갈색퍼짐병이 발생한 위치는 잔디의 대사활동이 감소하여 뿌리 분비물질이 적어지거나 달라질 수 있다. 이로 인하여 갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)에서 미생물상이 다른 것으로 판단된다.

**Metagenomic 데이터 분석**

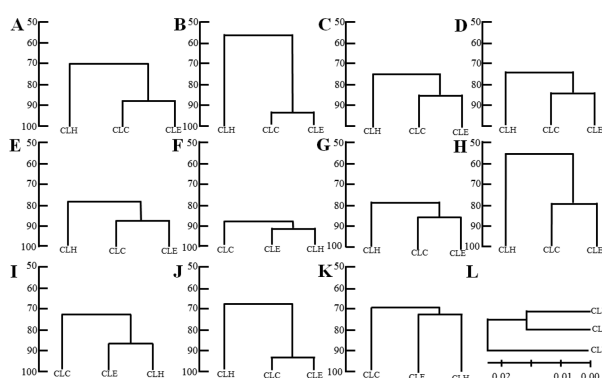
갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)



**Fig. 3.** Composition of rhizosphere microorganisms among the center (CLC), edge (CLE) and healthy part (CLH) of the large patch on September. A: total microorganisms; B: Proteobacteria; C: Acidobacteria; D: Actinobacteria; E: Chloroflexi; F: Firmicutes; G: Planctomycetes; H: Gemmatimonadetes; I: Nitrospira; J: Cyanobacteria; K: Verrucomicrobia; L: Bacteroidetes. The Venn diagram of represents overlap OTUs frequency among the samples.

에서 Phylum 수준에서 중복되는 미생물의 종류를 조사한 결과 중심부에서는 총 6,948 OTUs가 분포하였으며 가장자리와 건전부에서는 각각 6,505와 5,537 OTUs 분포하는 것으로 나타났다. 이중 모두 중복되는 미생물이 3,159 OTUs였으며 중심부와 가장자리의 4,757 OTUs가 중복되었으며 가장자리와 건전부는 3,713 OTUs였다. 또한 중심부와 건전부는 모두 3,618 OTUs가 중복된 것으로 나타났다. 또한 서로 중복되지 않는 OTUs는 중심부에서 1,372 OTUs, 가장자리와 건전부에서 각각 1,194 OTUs와 1,365 OTUs로 나타났다(Fig. 3A). Phylum 수준에서 OTUs가 높은 상위 11개 Phylum의 OTUs를 조사한 결과 Proteobacteria의 경우 중심부, 가장자리와 건전부에서 모두 중복된 것이 1,080 OTUs였으며 서로 중복되지 않는 OTUs는 각각 498, 483과 434로 모두 비슷한 분포로 나타났다(Fig. 3B). Acidobacteria는 모두 중복된 것이 822 OTUs였으며 중심부가 471 OTUs로 가장 높게 나타났으며 가장자리와 건전부는 217과 162 OTUs로 나타났다(Fig. 3C). Actinobacteria의 경우 중심부의 총 OTUs는 615였으며 가장자리와 건전부는 709와 891 OTUs로 나타났다. 또한 모두 중복되는 OTUs도 382로 높게 나타났으나 서로 중복되지 않는 OTUs는 건전부에서 286으로 중심부와 가장자리가 91과 126 OTUs인 것에 비하여 2~3배 이상으로 월등히 높게 나타났다(Fig. 3D). 이는 건전부의 근권토양에서 Actinobacteria가 높게 분포한다는 중요한 결과가 도출되었다. Chloroflexi의 경우에





**Fig. 4.** Clustering analysis of the rhizosphere microorganisms among the center (CLC), edge (CLE) and healthy (CLH) of the large patch on September. A: Proteobacteria; B: Acidobacteria; C: Actinobacteria; D: Chloroflexi; E: Firmicutes; F: Planctomycetes; G: Gemmatimonadetes; H: Nitrospira; J: Cyanobacteria; K: Verrucomicrobia; L: total microorganisms.

는 모두 중복되는 것이 222 OTUs로 나타났으며 가장자리에서 서로 중복되지 않는 것이 143 OTUs로 가장 높게 나타났다(Fig. 3E). Firmicutes의 경우에도 서로 중복되지 않는 OTUs가 중심부와 가장자리보다 건전부에서 2배 높게 나타났다(Fig. 3F). Planctomycetes는 모두 중복되는 것이 73 OTUs로 나타났고 서로 중복되지 않는 것은 중심부, 가장자리와 건전부에서 각각 26, 33과 38 OTUs로 비슷하게 나타났다(Fig. 3G). Gemmatimonadetes와 Nitrospirae의 모두 중복되는 OTUs는 각각 42와 26 OTUs로 나타났으며 중복되지 않는 것은 중심부, 가장자리와 건전부에서 Gemmatimonadetes에서는 44, 16과 21로 나타났으며 Nitrospirae는 18, 23과 1로 나타났다(Fig. 3H and I). 하지만 Actinobacteria에서 나타난 결과와 같이 건전부에서 특이하게 많은 분포를 나타내지는 않았다. 나머지 Cyanobacteria, Verrucomicrobia와 Bacteroidetes의 중복되는 것과 중복되지 않는 OTUs의 특이사항은 없으므로 나타났다(Fig. 3J, K and L).

갈색퍼짐병의 중심부(CLC), 가장자리(CLE)와 건전부(CLH) 근권 토양의 미생물을 Phylum 수준에서 OTUs 자료를 이용하여 집괴분석을 실시하였다. 유사도는 SIMPROF ( $p < 0.05$ )로 통계적으로 유의한 수준을 기준으로 구분되었다. 유사도를 분석한 결과 모두 중심부(CLC)와 가장자리(CLE)는 건전부(CLH)와 유의성 있게 차이가 나는 것으로 나타났다(Fig. 4A~J). Planctomycetes, Cyanobacteria와 Bacteroidetes는 가장자리(CLE)와 건전부(CLH)가 중심부(CLC)와 유의성을 나타내었다(Fig. 4E, I and K). 종 수준에서 분석한 OTUs 자료에 대한 집괴분석 결과는 중심부(CLC)와 가장자리(CLE)는 건전부(CLH)와 구분되어 나타났다(Fig. 4L). 건전부와 병이 진전되거나 병든 부분의 토양미생물군집은 차이가 나는 것으로 본 시험결과 나타났다. 건전부에서 Actinobacteria

의 OTUs가 다른 두 곳과 비교하여 23배 이상으로 월등히 높게 나타났으며 Phylum 수준에서 건전부와 병이 진전되거나 병든 부분의 토양미생물군집이 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이 결과 본 연구에서는 토양에서 방선균류를 대상으로 유용미생물을 분리하는 후속시험의 근거자료로 이용되었다. Actinobacteria속 세균은 그람 양성균으로 독립적으로 성장하거나 부생적으로 성장하는 균으로 토양이나 물 그리고 식물의 근권부에서 발견되는 균이다. 또한 22,500가지 정도의 생물학적 활성물질이 있다고 보고되어 있다(Berdy, 2005). Actinobacteria속 세균이 생성하는 이차 대사산물은 다양한 용도로 활용이 되는데 항암제, 항 바이러스제, 살균제, 제초제 그리고 살충제의 원료로 쓰이고 있다(Sangler, 1993). 농업적으로도 진균 병원균인 *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassicola*와 *Botrytis* sp.에 대한 방제에 이용하고 있다(Cao, 2004). 또한 갈색퍼짐병에 대한 생물적 방제를 위한 연구로 길항작용을 가지는 다양한 세균을 *Rhizoctonia solani*의 균사생장을 억제한 결과가 있으며(Song et al., 2012), *Streptomyces albidoflavus*가 *Rhizoctonia solani*를 억제하기 위한 최적 성장 조건에 대한 연구가 있다(Islam et al., 2009). 본 연구에서 건전부(CLH) 근권 토양과 중심부(CLC)와 가장자리(CLE)를 비교하였을 때 Actinobacteria의 OTUs가 건전부(CLH)에 월등히 높았던 결과로 비추어볼 때 앞에서 언급한 이차대사산물이 가지는 살균효과 등의 다양한 작용에 의해 병이 발생하지 않았다고 사료되며 또한 유용미생물을 분리할 때 Metagenomics 데이터가 충분한 근거자료로 활용될 수 있다고 판단된다.

## 요 약

갈색퍼짐병은 토양 병원성균으로 *Rhizoctonia solani* AG-2 IV가 원인균이다. 한국잔디나 버뮤다글라스와 같은 난지형 잔디에 가장 중요한 병으로 알려져 있다. 본 연구는 갈색퍼짐병 발병토양의 미생물 군집 분석으로 생물적 방제제로 이용할 근거자료를 수집하기 위하여 실시하였다. 갈색퍼짐병의 중심부(CLC)와 가장자리(CLE), 건전부(CLH)에서 채취한 근권부 토양의 미생물 군집(bacterial composition)을 Metagenomics 데이터 분석으로 Phylum 수준에서 조사한 결과 미생물상은 Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Nitrospira, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes 등의 순으로 분포 경향은 모두 유사하게 나타났다. 이에 반해 Actinobacteria의 경우 중심부에서 9.28%, 가장자리에서 10.84%로 건전부에서의 16%에 비하여 5~6% 정도 높은 비율로 분포하는 결과가 나타났다. Phylum 수준에서 중복되는 미생물의 중

류를 조사한 결과 전체적으로 중심부에서는 총 6,948 OTUs가 분포하였으며 가장자리와 건전부에서는 각각 6,505와 5,537 OTUs 분포하는 것으로 나타났다. Actinobacteria의 경우 중심부의 총 OTUs는 615였으며 가장자리와 건전부는 709와 891 OTUs로 나타났다. 또한 모두 중복되는 OTUs도 382로 높게 나타났으나 서로 중복되지 않는 OTUs는 건전부에서 286으로 중심부와 가장자리가 91과 126 OTUs인 것에 비하여 2~3배 이상으로 월등히 높게 나타났다.

**주요어:** 갈색퍼짐병, Metagenomics, 갈색퍼짐병균, 한국잔디

## Acknowledgements

This research was performed with the support of the "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (PJ011012)" from the Rural Development Administration of Korea.

## References

- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Bray, J.R. and Curtis, J.T. 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27:325-349.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *J. Antibiot.* 58:1-26.
- Cao, L., Qiu, Z., Dai, X., Tan, H., Lin, Y., et al. 2004. Isolation of endophytic actinobacteria from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20:501-504.
- Clarke, K.R. and Gorley, R.N. 2006. PRIMER V6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E Ltd, Plymouth, U.K. pp. 1-190.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. and Scannell, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:10494-10499.
- Daniel, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:470-478.
- De Leij, F.A.A.M., Whipps, J.M. and Lynch, J.M. 1993. The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microb. Ecol.* 27:81-97.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., et al. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC. Genomics.* 7:57.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:669-685.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5:245-249.
- Islam, M.R., Jeong, Y.T., Ryu, Y.J., Song, C.H. and Lee, Y.S. 2009. Isolation, identification and optimal culture conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 producing antifungal agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiology.* 37:114-120.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.W., et al. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2264-2274.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. pp. 115-175. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematic.* John Wiley & Sons, New York, USA.
- Mackelprang, R., Waldrop, K.M., DeAngelis, M.P., David, M.M., Chavarria, K.L., et al. 2011. Metagenomic analysis of a permafrost microbial community reveals a rapid response to thaw. *Nature* 480:368-371.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., Teske, A. and Wawer, C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. pp. 23. In: Akkermans, A. (Ed.). *Molecular microbial ecology manual.* Kluwer Academic Publ., Norwell, MA, USA.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65.
- Sanglier, J.J., Haag, H., Huck, T.A. and Fehr, T. 1993. Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* 144:633-642.
- Song, C.H., Islam, M.R., Chang, T. and Lee, Y.S. 2012. Isolation and identification of antagonistic bacteria for biological control of large patch disease of zoysiagrass caused by *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV) Asian J. Turfgrass Sci. 26:8-16.
- Torsvik, V., Sorheim, R. and Goksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities-a review. *J. Ind. Microbiol.* 17:170-178.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.