

벼 뿌리 내생 항균성 *Serratia marcescens*의 분리 및 동정이숙경 · 송완엽¹ · 김형무*전북대학교 농생물학과, ¹전북대학교 농업과학기술연구소Isolation and Identification of Rice Root Endophytic Antagonistic *Serratia marcescens*Sook-Kyung Lee, Wan-Yeob Song¹ and Hyung-Moo Kim*

Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹Institute of Agricultural Science & Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received on January 26, 2004)

Twenty-three strains of *Serratia* sp., isolated from surface-sterilized rice roots collected in Chonbuk and Chungnam province, were identified and characterized. They were Gram-negative, rod shaped and red pigmented typically and their endophytism was confirmed by inoculation and reisolation of the strains *in planta*. Their antifungal activity against 4 rice pathogenic fungi was compared and ranged from 62.4 to 85.2% against *Rhizoctonia solani* and 68.0 to 88.5% against *Pyricularia grisea*. Among the 23 strains tested, strain RSm220 showed the strongest inhibition activity against 4 pathogenic fungi. The strain was, therefore, selected as a biocontrol candidate for both the pathogens and its bacteriological characteristics and 16S rDNA sequences were analyzed. Phenotypic and biochemical characteristics of the selected RSm220 were highly related to the type strain of *S. marcescens* and 16S rDNA sequencing of RSm220 showed a homology of 98.2% to the type strain of *S. marcescens*. The strain RSm220 was identified as *S. marcescens* and the inhibition result of this endophytic strain indicates that it is a potential biocontrol agent for *R. solani* and *P. grisea*.

Keywords : Biocontrol, endophyte, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Serratia marcescens*

색소를 가진 enterobacterium인 *Serratia marcescens*는 Gram 음성의 간균으로서, 적색 색소인 prodigiosin을 생산하여 붉은색 집락을 형성하는 것을 전형적인 특징으로 하며 항균 활성과 관련이 있는 chitinase를 강하게 분비하는 것으로 알려져 있다(Balows 등, 1992; Kalbe 등, 1996; McInory 등, 1995). *S. marcescens*는 토양과 식물의 뿌리 표피세포, 통기조직, 물관부에 존재하는 것으로 보고되어 있다(Hallmann 등, 1997).

식물 내생세균은 식물의 종자와 배주(Mundt와 Hinkle, 1976), 과실(Samish 등, 1961), 줄기(Misaghi와 Donndelinger, 1990), 뿌리(Germida 등, 1998; Jacobs 등, 1985) 및 괴경(Hollis, 1951; Sturz 등, 1998)을 포함하는 식물 조직부위에 집락화 되어 있으나 병을 일으키지는 않는다. 식물 내

생세균은 양파와 감자(Frommel 등, 1991), 옥수수(Fisher 등, 1992), 목화(Misaghi와 Donndelinger, 1990), Kallar grass(Reinhold-Hurek와 Hurek, 1998), 사탕수수(James와 Olivares, 1998) 및 벼(Barraquio 등, 1997)등의 건전주에서의 분리가 보고된 바 있다. 내생세균은 주로 도관 조직(Frommel 등, 1991; James와 Olivares, 1998) 또는 도관과 피층조직(Hurek 등, 1994)등에 집락화 되어 있으며 벼에서는 내생세균의 수가 건조중량 g당 10^5 - 10^8 으로 존재함이 확인된 바 있다(Barraquio 등, 1997).

*S. marcescens*는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* 과 *Colletotrichum orbiculare*의 균사 생장을 억제하는 것 뿐만 아니라 오이에서 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*의 저항성을 유도(Liu 등, 1995) 하며, *Botrytis* sp.(Akutsu 등, 1993)와 *Phytophthora capsici*(Okamoto 등, 1998)의 억제에도 효과가 있음이 보고된 바 있다. 그 외에도 식물의 전신저항성 유도(Press 등, 1997)와 높은 chitinase 활성(Kalbe 등, 1996; McInory 등, 1995)을 이용한 생물학적

*Corresponding author

Phone)+82-63-270-2527, Fax)+82-63-270-2531

E-mail)mc1258@chonbuk.ac.kr

방제가 시도된 바 있다.

내생균의 항균능력을 이용한 생물학적 방제가 시도되고 있으며, 내생균은 진균 억제 뿐만 아니라 식물의 저항성 유도(Press 등, 1997)에도 관련되어 있음이 보고된 바 있다. 길항작용을 하는 내생 세균은 병원균과 생태적 지위를 같이 하면서 상호작용을 함으로서 토양 또는 근권세균을 이용한 방제에 비하여 병원균의 억제에 유리한 특성을 가지고 있다. 벼에 있어서 내생세균에 대한 연구는 주로 *Azoxycus* sp.(Egener 등, 1999), *Acetobacter diazotrophicus*와 *Herbaspirillum* spp.(Boddey 등, 1995; James 등, 1998)과 같은 질소고정 세균과 관련된 연구들이나 *S. marcescens*는 뿌리, 잎 및 줄기의 내부에 존재하고, 뿌리의 주근뿐만 아니라 어린 측근에서도 다량이 관찰(Gyaneshwar 등, 2001)된 바 있어 효율적인 생물학적 방제제로서의 이용 가능성이 있다.

*Pyricularia grisea*와 *Rhizoctonia solani*는 벼의 주요 병원균으로 효율적이고 안정적인 방제수단의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구를 통하여 두 병원균의 효율적인 방제를 위해 이용 가능한 길항능력을 가진 벼 내생성 *S. marcescens*를 분리 동정하여 생물학적 방제제로의 이용 가능성을 검토 하고자 한다.

재료 및 방법

공시 균주. 본 연구에 사용한 대조균주인 *Serratia marcescens* KACC10002와 KACC 10502, *Rhizoctonia solani* KACC40106, *Pyricularia grisea* KACC40425, *Fusarium roseum* KACC40049 및 *Fusarium* sp. KACC40258는 한국 농용미생물 보존센터(KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

벼 뿌리로부터 내생세균의 분리. 2001-2003년에 걸쳐 전북, 충남 일대의 벼 포장에서 뿌리를 수집하였다. 수집된 뿌리는 표면 소독을 위해 1% chloramine T에서 15분 동안 교반한 뒤 멸균한 phosphate buffer를 이용하여 세척하였다. 다시 뿌리를 20 g의 glass bead와 phosphate buffer를 섞어 20분 동안 교반한 뒤 phosphate buffer를 이용하여 4번 세척하였다. 표면 살균이 이루어진 뿌리는 phosphate buffer와 함께 마쇄한 뒤 10배수로 희석하여 tryptic soy agar(TSA) 평판배지에 접종하였다(Barraquio 등, 1997).

내생 세균의 확인. 분리된 세균의 내생성을 확인하기 위해 건전한 벼의 유효묘에 접종을 하여 재분리를 하였다. 벼 종자는 외피를 벗겨내고, 70% ethanol에 5분 동안 침지시킨 후 멸균수로 세척한 뒤 멸균된 1.0% NaOCl에서 45분 동안 침지시킨 후 멸균 증류수에 6번 세척을 하여 표면 소독을 하였다. 표면 소독된 종자는 TSA 배지에 치

상하여 30°C에서 2일 동안 배양하여 발아를 유도하고, 종자의 오염 여부를 확인하였다. 이 발아된 벼 종자는 25 ml의 반고체 Murashige와 Skoog 배지와 멸균된 토양이 들어 있는 25×200 mm 실험관에 치상하였다. 종자 발아 후 3-5일이 지나 벼 유효묘가 최소 5.0 cm 이상으로 자라면 접종원인 분리주들을 tryptic soy broth(TSB)에 24시간 동안 배양한 후 1×10^7 CFU/ml의 농도로 100 μ l씩 건전한 벼 유효 뿌리에 3반복씩 접종하였다. 접종 후 28°C의 생장상에서 23~25일 경과 후 내생 세균을 재분리하기 위해 벼 뿌리만을 분리하여 1.0% NaOCl에서 15분 동안 침지시킨 후 멸균 증류수에 6번 세척을 하여 표면 소독을 하였다. 뿌리 조직은 2배 부피의 phosphate buffer와 함께 마쇄한 뒤 10배수로 희석하여 TSA 배지에 접종하였다.

실내에서의 *S. marcescens*의 길항능력 검정. 내생성이 확인된 분리 세균의 현탁액(1×10^7 CFU/ml)을 10 μ l씩 직경 90 mm인 petri dish에 분주된 TSA와 PDA배지에 spot 접종하였다. 30°C에서 24시간 동안 배양한 후 배양된 직경 5 mm의 *R. solani*, *P. grisea*, *Fusarium* sp., 또는 *Fusarium roseum* 균사체를 배지의 중앙에 치상하여 25°C에서 7일 동안 배양하면서 억제 정도를 조사하였으며 3반복씩 실험을 수행하였다.

생리·생화학적 성질. 분리 균주의 주요 생리, 생화학 특성들을 조사하기 위하여 flagella형성, catalase와 oxidase test, poly- β -hydroxybutyrate(PHB) 축적, chitinase, hydrogen cyanide(HCH), siderophore 분비 등을 조사하였다. PHB 축적, nitrate reduction, gelatin 액화, lecithinase, indole과 acetoin 생산, starch hydrolysis, urase 생산 등은 Jean과 Joan(2000)의 Biochemical tests for identification of medical bacteria를 참고하여 실시하였고, arginine dihydrolase와 lipase는 Misaghi와 Gordon의 방법(1969)에 따라 수행하였다. Levan 생성과 catalase 반응은 Lelliotte의 법(1966), siderophore 생산은 Schwyn과 Neiland의 방법(1987), HCN은 Wei 등의 방법(1966), chitinase는 Monreal과 Reese의 방법(1969), protease는 Budi 등의 방법(2000)에 따라서 조사하였다. 생육 온도 조사는 nutrient broth에 접종한 후 4°C, 20°C, 37°C, 40°C에서 2일간 배양 후 생육 정도를 조사하였다.

탄소원과 질소원 이용성을 조사하기 위해 GN microplate (Biolog Inc, USA)를 이용하여 95종의 탄소원 및 질소원의 이용성을 조사하였다. GN microplate는 OD₅₉₀ 0.25의 농도로 조정된 접종원을 150 μ l씩 접종한 후, 30°C에서 24시간 배양한 뒤 결과를 Biolog GN data version 2.0으로 분석하였다.

16S rDNA의 증폭과 sequencing. 대상 세균의 genomic

DNA 분리는 일반적으로 사용하는 방법을 이용하였다 (Sambrook 등, 2001). 16S ribosomal DNA의 PCR 증폭을 위해 27F와 1495R(Marchesi 등, 1998)의 primer를 사용되었다. 각 반응은 AccuPower HL premix(Bioneer Co.)를 이용하였고, 각 primer는 4.5 pmol, genomic DNA는 μ l당 10 ng의 농도로 반응에 이용하였다. 모든 증폭은 Perkin Elmer 9600 thermocycler(Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 이용하여 이루어졌다. 증폭과정은 95°C에서 3분간 처리한 후, 94°C에서 30초, 56.5°C에서 30초, 72°C에서 90초의 조건으로 32 cycle의 PCR증폭을 수행한 후 72°C에서 7분간 처리하였으며, 최종 PCR 산물을 1.0% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다.

전기영동으로 확인된 band는 AccuPrep™ Gel extraction kit(Bioneer Co.)을 이용하여 DNA를 추출하였다. DNA sequencing은 ABI 377 Prism DNA sequencer를 이용하였다. Sequencing을 위한 primer는 27F, 575F, 765R, 930F 및

1495R(Marchesi 등, 1998)을 사용하였다. DNASTAR program을 이용하여 sequences들을 결합하여 완성한 후 phylogenetic tree를 작성하였고, BLAST search를 통하여 nucleotide sequence의 유사도를 조사하였다.

결과 및 고찰

내생성 *S. marcescens* 분리. 벼 뿌리에서 다음과 같은 방법으로 내생성 *S. marcescens*를 분리하였다(Barraquio 등, 1997). 수집된 벼 뿌리로부터 재료 및 방법에서 서술한 방법으로 분리하였으며, 분리된 내생세균 중 붉은 색소를 나타내는 *S. marcescens*으로 추정되는 65분리주를 분리하였다. 이렇게 분리된 내생성 세균들을 *in planta* system에서 종자단계에서부터 표면 소독에 의해 준비된 무병의 건전한 식물체에 다시 접종하여 내생성을 증명하였다. 이 방법에 의해 최종적으로 23개의 *S. marcescens*

Table 1. Antifungal activity of endophytic *Serratia marcescens* isolates isolated from rice roots

Isolate No.	Collection place	Growth inhibition of fungi ^{a)} (%)			
		<i>R. solani</i> (KACC40106)	<i>P. grisea</i> (KACC40425)	<i>Fusarium</i> sp. (KACC40258)	<i>F. roseum</i> (KACC40049)
RSm101	ChonbukJinan	70.4 ^{b)}	74.2	32.3	16.4
RSm105	ChonbukGimje	78.9	79.5	28.1	32.0
RSm108	ChungnamNonsan	80.5	68.7	33.3	30.5
RSm120	ChonbukBongdong	77.2	76.5	36.5	28.8
RSm123	ChonbukGosan	62.4	88.5	25.6	29.4
RSm128	ChungnamSesan	71.2	80.2	18.0	32.4
RSm133	ChungnamBuyeo	68.4	81.4	22.3	19.6
RSm135	ChonbukIksan	75.6	79.2	34.6	26.8
RSm138	ChonbukBuan	77.8	77.1	37.1	28.4
RSm140	ChungnamSochon	81.5	75.6	23.6	33.3
RSm141	ChonbukGimje	72.6	80.6	28.8	35.8
RSm142	ChungnamSesan	79.5	81.7	19.8	27.7
RSm146	ChungnamDangjin	85.2	68.0	24.8	28.9
RSm148	ChonbukGosan	68.8	75.2	28.5	35.4
RSm151	ChonbukBongdong	75.9	74.3	22.2	26.4
RSm154	ChonbukGimje	71.5	77.5	35.9	22.5
RSm161	ChonbukGimje	80.1	79.4	26.8	30.0
RSm173	ChungnamBuyeo	82.0	80.5	33.3	34.5
RSm188	ChonbukGimje	79.4	80.3	23.6	29.4
RSm220	ChonbukJinan	83.9	88.3	30.0	35.2
RSm227	ChonbukIksan	78.1	71.2	32.6	31.2
RSm229	ChungnamYesan	77.7	74.6	19.6	25.3
RSm233	ChonbukBuan	71.5	78.1	25.1	16.4

^{a)} Values represent mean of three replicates.

^{b)} Percent growth inhibition = $(1 - D2/D1) \times 100$

Where, D1 = Distance between fungal agar disk and bacterial spot; D2 = Length of mycelial growth.

으로 추정되는 세균을 확보하였다. 지금까지 연구되어온 *S. marcescens*는 대부분이 토양에서 분리한 균주이다. 그러나 식물 내생 *S. marcescens*는 생태적 지위가 병원균들과 비슷하므로 생물학적 방제제로의 효율이 토양에서 분리한 *S. marcescens*보다 훨씬 높을 것으로 추정된다. 따라서 분리된 세균이 내생세균임을 증명하는 과정은 중요하다 할 수 있다.

***S. marcescens*의 길항능력 검증.** 벼 뿌리 내생세균으로 분리된 23개의 세균을 이용하여 벼 포장에서 문제시되는 *R. solani*, *P. grisea*, *Fusarium* sp. 및 *F. roseum*에 대한 길항성을 조사하였다(Table 1). 분리된 23개의 세균이 전반적으로 *R. solani*와 *P. grisea*에는 억제 효과가 60% 이상이었으나, *Fusarium* sp.와 *F. roseum*에는 40%이하의 억제력을 보였다. 한편, 균주 간에 같은 병원 진균에 대해 각기 다른 억제력을 보였다. 이들 중 RSm146은 *R. solani*에 85.2%의 억제력을 보였으나, *P. grisea*에는 68%로 비교적 낮은 억제력을 보였다. 반면 RSm123은 *R. solani*에는 62.4%의 억제력을 보였으나, *P. grisea*에는 88.5%의 억제력을 보였다. ReSm220은 *R. solani*와 *P. grisea*에 83.9%와 88.3%의 억제력을 보였다. 23개의 분리주 중 두 가지 대상 병원균에 대한 억제력이 가장 강한 RSm220을 벼 도열병과 잎집무늬마름병을 방제할 수 있는 균주로서 선발하였다. Someya 등(2000)에 의한 연구에서는 *Fusarium* sp.와 *F. roseum*에 대하여 70%이상의 억제력을 보이는 것으로 보고 되어 있으나 본 연구에서는 *Fusarium* sp.와 *F.*

Table 2. Comparison of the bacteriological characteristics of the endophytic isolate RSm220 with two type strains of *Serratia marcescens*

Characteristics	<i>S. marcescens</i>		
	RSm220	(KACC 10002)	(KACC 10502)
Flagellum	1	1	1
Catalase	+ ^{a)}	+	+
Oxidase	+	+	+
Poly-β-hydroxybutyrate	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+
Lecithinase	+	+	+
Indole	+	+	+
Acetoin production	+	+	+
Levan formation	-	-	-
Pectate degradation	-	-	-
Temperature 4°C	-	-	-
20°C	+	+	+
37°C	+	+	+
40°C	-	-	-
Fermentation of glucose	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-
Urase production	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-
Citrate test	+	+	+
HCN	-	-	-
Lipase hydrolysis	+	-	+
Chitinase	+	+	+
Protease	+	-	+
Siderophore	-	-	-
Acid production from :			
D-Mannose	+	+	+
Galactose	+	+	+
D-Galactonic acid latone	-	+	+
D-Glucosamic acid	-	+	+
Saccharose	+	+	+
L-Arabinose	-	+	+
Glycerol	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Citric acid	+	+	+
Formic acid	-	+	+
Utilization of :			
Dextrin	+	+	+
Glycogen	+	+	+
Tween 40	+	+	+
Tween 80	+	+	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+
Adonitol	+	+	+
Xylitol	+	+	+

^{a)} + : positive, - : negative.

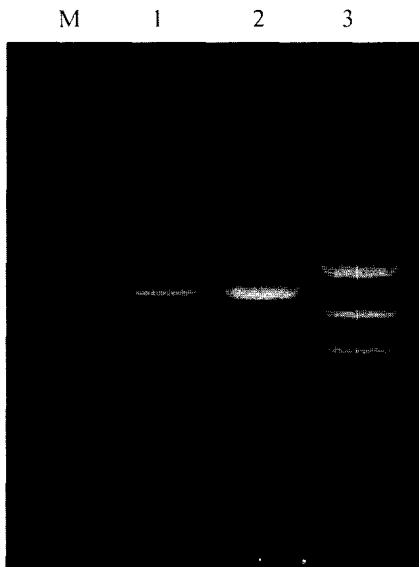


Fig. 1. PCR-amplified products (1.5 kb) obtained by using strain RSm220 and 27F & 1495R primers. Lanes: M, PCR marker (Promega, USA); 1, RSm220; 2, *S. marcescens* KACC10002; and 3, DNA mass ladder (Promega, USA).

*roseum*에서 보다는 *R. solani*와 *P. grisea*에서 높은 억제 능력을 보였다.

생리·생화학적 성질. *R. solani*와 *P. grisea*에 강한 억제 능력을 보인 RSm220을 동정하기 위하여 공시 균주인 *S. marcescens* KACC 10002, 10502 균주를 대조로 하여 생리·생화학적 실험을 수행하였다. RSm220 균주의 생화학적 특성은 단극모를 가지는 간상형의 형태이고, catalase, oxidase, nitrate reduction, gelatin 액화, lecithinase, indole과 acetoin 생산, glucose fermentation, citrate 생산, lipase, chitinase 및 protease 생산 등에는 양성의 반응을 보였다. 한편 PHB축적, arginine dihydrolase, levan 형성, pectate 분해, starch hydrolysis, urase와 H₂S 생산, phenylalanine deaminase, HCN 및 siderophore생산에는 음성의 반응을 보였다. 생육 온도 조사시에 20°C와 37°C에서는 생육하나 4°C와 40°C에는 생육이 불가능한 것으로 나타났다. 25종류의 생화학적인 실험 결과 벼 뿌리에서 분리된 내생세균인 RSm220은 공시 균주인 *S. marcescens* KACC 10002, 10502와 결과가 대부분 일치하였다(Table 2). 그러나 protease의 경우, *S. marcescens* KACC 10002, 10502에서는 분비되지 않았으나, RSm220에서는 분비되었고, 항균력과 관련이 있는 chitinase의 분비능력은 Akutsu 등(1993)과 Okamoto 등(1998)에 의해 보고된 것보다 RSm220이 높은 것을 볼 수 있었다.

벼 뿌리에서 분리한 내생 세균인 RSm220은 GN micro plates Biolog를 이용한 탄소원과 질소원의 이용성 조사에 있어서 반응 결과가 공시균주인 *S. marcescens* KACC 10002와 10502 균주와 거의 일치하였으나, D-galactonic

acid latone, D-glucosamic acid, L-arabinose, formic acid의 반응에서는 차이를 보였다(Table 2). 본 실험 결과들을 Biolog program(Biolog GN data version 2.0)에서 비교한 결과 *S. marcescens*와 83.5%의 유사도를 나타내었다.

16S rDNA sequencing에 의한 계통 분석. RSm220의 genomic DNA를 분리한 후 27F와 1495R primer를 이용하여 증폭한 결과 1.5 kb의 밴드를 확인하였다(Fig. 1). 분리된 RSm220의 16S rDNA 절편의 sequence를 확인한 결과 *S. marcescens* type strain LMG 2792의 16S rDNA sequence(GeneBank accession no. AJ133431)에 98.2% 유사성을 나타내었다(Fig. 2). 그러므로 벼 뿌리에서 분리된 고 항균활성 보유 내생 세균 RSm220은 생리·생화학적 성질과 16S rDNA sequence에 의한 계통 분석에 의해 *S. marcescens*로 동정되었다.

요 약

벼에서 문제시되는 도열병과 잎집무늬마름병을 생물학적으로 방제하기 위해 병원균과 생태학적 지위가 비슷한 벼 뿌리에서 내생하는 *S. marcescens* 23 균주를 분리하였다. 선발 균주들을 공시하여 *R. solani*와 *P. grisea*에 대한 길항능력을 검정하여 *R. solani*와 *P. grisea*에 각각 83.9%, 88.3%의 높은 억제율을 보인 RSm220 균주를 선발하였다. 선발된 RSm220은 생리·생화학적 특성 검정결과 *S. marcescens* type strain과 높은 상관성을 나타내었고, 16S rDNA sequencing에 의한 계통 분석에 의해 *S. marcescens*의 16S rDNA sequence에 98.2% 유사성을 나타내어 *S. marcescens*로 동정되었다. 내생성 *S. marcescens* RSm220은 벼 도열병과 잎집무늬마름병에 대한 생물학적 방제제로의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

Akutsu, K., Hirata, A., Yamamoto, M., Hirayae, K., Okayama, S. and Hibi, T. 1993. Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia marcescens* B2 isolated from tomato phylloplane. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 18-25.

Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. 1992. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, application. Pages 2822-2848 in *The prokaryotes*. Second edition.

Barraquio, W. L., Revilla, L. and Ladha, J. K. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil* 194: 15-24.

Boddey, R. M., de Oliveira, O. C., Urquiaga, S., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, V. L. D. and Dobreiner, J. 1995.

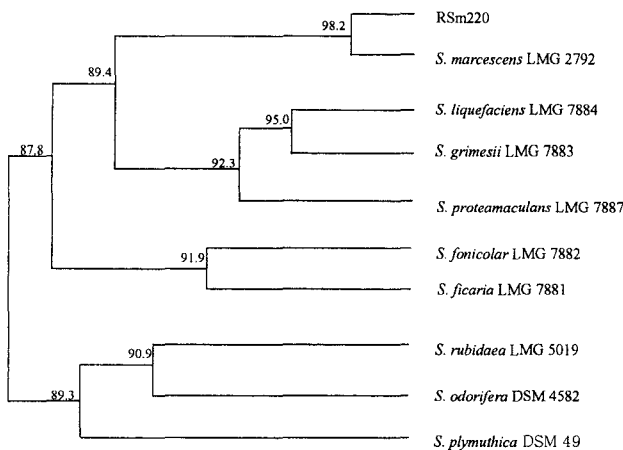


Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of *S. marcescens* RSm220 and the representatives of some other *Serratia* spp. published previously. The tree was constructed with the Clustral algorithm of the MegAlign program (DNASTAR, WI, US).

- Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contribution and prospects for improvement. *Plant and Soil* 174: 195-209.
- Budi, S. W., Tuinen, D. V., Arnould, C. and Gianinazzi, S. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied soil ecology* 15: 191-199.
- Egener, T., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. 1999. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoacus* sp. strain BH72 in rice roots. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 12: 813.
- Fisher, P. J., Petrini, O. and Lappin, H. M. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophyte in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist* 122: 299-305.
- Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. 1997. Salicylic acid produced by *S. marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 10: 761-768.
- Frommel, M. I., Nowark, J. and Lazarovits, G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* sp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928-936.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., de Freitas, R. and Seib, A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 43-50.
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Mathan, N., Reddy, P. M., Reinhold-hurek, B. and Ladha, J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 183: 2634-2645.
- Hallmann, J., Quadl-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hollis, J. P. 1951. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology* 41: 350-366.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., van Montagu, M. and Kellenberger, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoacus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176: 1913-1923.
- James, E. K. and Olivares, F. L. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 77-119.
- Jean, F. M. and Joan, M. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd edition. Lippincott Williams and Wilkins. pp. 3-451.
- Kalbe, C., Marten, P. and Berg, G. 1996. Strains of genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol. Res.* 151: 433-439.
- Lelliotte, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* sp.. *J. Appl. Bacteriol.* 29: 470-489.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 695-698.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. and Wade, W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795-799.
- McInroy, J. A. and Kloepper, J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-349.
- Misaghi, I. J. and Donndelinger, C. R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- Misaghi, I. and Grogan, G. H. 1969. Nutritional and biochemical comparison of plant pathogenic and saprophytic fluorescent *Pseudomonas* sp.. *Phytopathology* 59: 1436-1450.
- Monreal, J. and Reese, E. T. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 15: 689-696.
- Mundt, J. O. and Hinkle, N. F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.
- Okamoto, H., Sato, M., Sato, Z. and Isaka, M. 1998. Biocontrol of *Phytophthora capsici* by *Serratia marcescens* F-1-1 and analysis of biocontrol mechanism using transposon-insertion mutants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 287-293.
- Reinhold-Hurek, B. and Hutek, T. 1998. Interactions of graminaceous plants with *Azoacus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 29-54.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samish, Z., Etlinger-Tulczynska, R. and Bick, M. 1961. Microflora within healthy tomatoes. *Appl. Microbiol.* 9: 20-25.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.
- Someya, N. and Kataoka, N. 2000. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis.* 84: 334-340.
- Sturz, A. V., Christie, B. R. and Matheson, B. G. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44: 162-167.
- Wei, G., Joseph, W. and Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512.