The Korean Journal of Microbiology (2011) Vol. 47, No. 4, pp. 375-380
Copyright ⓒ 2011, The Microbiological Society of Korea

# 벼(*Orysa sativa* L.) 뿌리로부터 분리된 내생 *Streptomyces* 균주의 동정 및 특성

김재헌* · 이준관
단국대학교 미생물학과

# Identification and Characterization of an Endophytic Strain of *Streptomyces* from Rice Roots (*Orysa sativa* L.)

**Jae-heon Kim* and Jun-kwan Lee**
*Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea*
(Received November 15, 2011 / Accepted December 14, 2011)

**We isolated an endophytic actionmycete from root tissues of rice plant collected from paddy field near Dankook University, Cheonan, Korea. Surface sterilized roots were laid on the selective agar plates and incubated. The powdery actinomycete colonies appeared on the root surface after four weeks incubation. We isolated a strain JK-5 among them and could determine its taxonomical position as *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* by using 16S ribosomal DNA sequencing. The chemotaxonomical and morphological studies confirmed the taxonomical position of the strain JK-5. The shape of aerial hyphae was flexible and they contained spore chains with more than 30 smooth spherical spores per chain. Cell walls contained LL-diaminopimelic acid. There was no characteristic sugar in whole-cell hydrolysates. The major fatty acids were anteiso-15:0, anteiso-17:0 and iso-16:0. The specific menaquinones, MK-9 ($H_6$), MK-9 ($H_8$), were detected. The GC content was 72%. Antifungal activities of the strain JK-5 were relatively strong against fungal plant pathogens. The endophytic growth of the strain JK-5 was confirmed by SEM observation of the root and stem of the infected rice plant.**

***Keywords*:** antifungal activity, endophyte, rice plant, root, streptomycete

쌀은 아시아를 비롯한 세계 각국에서 생산되어 2010년의 생산량이 약5억 톤에 이르러 밀 다음으로 중요한 곡물이다. 이러한 중요성에 걸맞게 많은 종류의 내생세균이 벼의 잎, 뿌리, 숙성중인 쌀알 등에서 다양하게 발견되어 왔다(1, 5, 6, 14). 한국에서 쌀은 2010년의 생산량이 429 만톤으로 전체 곡물 생산의 90% 정도를 차지하는 절대적으로 중요한 곡물이다. 한국의 벼에서는 *Burkhoderia*와 *Serratia* 등이 주된 내생세균으로 보고되었고 이들이 병원성 진균류에 대한 항진균활성을 보유하는 것으로 보고되었다(12, 18). 일본에서는 *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Mycobacterium* 등이 주요 내생세균으로 보고되었다(13). 중국에서는 *Stenotrophomonas*가 우점종으로 보고되었고 특히 Archaea의 존재도 알려 졌다(21). 인도 카르타나카 주의 벼에서는 *Streptomyces*가 우점종으로 보고되었고 이들 역시 황진균 활성이 있었다(17). 필리핀의 벼로부터는 *Enterobacter*와 *Bacillus*가 분리되었다(16).

내생세균이 항생물질을 분비하거나 생장호르몬 분비를 자극하는 것이 알려져 있으므로 벼 뿌리에서 분리된 내생세균을 이용하여 벼의 생장을 촉진하거나 병원균에 대한 저항성을 증가시켜 쌀 생산량을 증가시키려는 시도가 있었다(8, 15).

방선균류가 옥수수 등의 여러 식량 작물에서 내생세균으로 존재하고 식물의 생장에 도움을 주는 것은 자주 보고되었다. (3, 4, 20). 그러나 내생 방선균류에 대한 보고는 아직 많지 않다. 따라서 이 논문에서는 벼 뿌리에 내생하고 있는 방선균을 분리 동정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료, 표면 살균 처리, 배지조성 및 배양조건

본 실험에서 사용된 벼 뿌리 시료는 충남 천안의 단국대학교 근처에서 재배 중인 벼로부터 얻었다. 벼 품종은 Kinuhikari

* For correspondence. E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr; Tel.: +82-41-550-3452; Fax: +82-41-559-7857

(기누히까리), Keunnunbyeo (큰눈벼), Heugjinjubyeo (흑진주벼), Baekjinjubyeo (백진주벼), Heugseonchalbyeo (흑선찰벼) 등으로 벼는 유묘(5월), 추수하기 직전(8월), 수확 후 남은 벼뿌리(12월)로 시기를 나누어 채취하였다. 실험에 들어가기 앞서서 벼 뿌리에 남아있는 수분과 흙을 제거하였다. 벼 표면은 3단계의 표면 살균과정을 거쳐 살균하였고(99% ethanol 60초, 3.125% NaOCl 6분, 99% ethanol 30초) 멸균된 3차 증류수로 세척하고 세척액을 LB에 접종하여 세균이 자라지 않는 것을 확인하였다. 표면 살균된 벼 뿌리는 1 cm 간격으로 잘라 배지에 하나씩 올려놓고, 27°C에서 4주 동안 배양하였다. 배지로는 tap water-yeast extract agar (TWYE; yeast extract 0.25 g, $K_2HPO_4$ 0.3 g, agar 18 g, 수돗물 1 L)와 yeast extract-casein hydrolysate agar (YECD; yeast extract 0.3 g, D-glucose 0.3 g, $K_2HPO_4$ 2 g, agar 18 g, 증류수 1 L)를 사용하였다. 멸균 후에 곰팡이의 성장을 억제시키기 위해 benomyl 50 mg/ml을 첨가하였다. 4주 배양 후에, 벼 뿌리 표면에서 육안으로 볼 수 있을 정도로 자란 내생 방선균이 나타나면 백금이를 이용하여 단일 콜로니를 채취한 후에 순수배양하여 4 주 동안 배양하였다.

### 16S rDNA 증폭 및 염기서열의 결정

분리된 균의 16S rDNA를 증폭하기 위해서 콜로니 PCR 방법을 사용하였다. 정방향 프라이머(27F, 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3′)와 역방향 프라이머(1492R, 5′-GGYTACCTTGTTACGACTT-35′)를 사용하였으며, 분리균의 단일 콜로니를 획득하여 (주)Bioneer에서 판매하는 PCR premix (Taq DNA polymerase 1 unit, dNTPs 0.25 mM, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM)안으로 넣어준 후에 각각의 프라이머 1 μl씩 넣어주고 멸균된 증류수를 17 μl 넣어 PCR하였다. PCR 산물은 정제 kit (PCR Purification Kit; Bioneer, Korea)을 사용하여 정제한 후, (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 GenBank와 Eztaxon의 DNA database와 비교하였다.

### 주사전자현미경 관찰

분리균을 YEME 평판배지(yeast extract 4 g, malt extract 10 g, agar 1.5 g, 증류수 1 L, pH 7.2)에 접종한 후 30°C에서 14일간 배양하였다. 균체를 8% glutaraldehyde 용액으로 1일간 예비 고정한 후 포자형성이 잘된 부위를 채취하여 1 일간 동결건조하고 금박을 입히고 SEM (model 515, Phillips, The Netherlands)으로 관찰하였다. 벼 조직의 내생세균을 관찰하기 위해서는 3-4주 배양한 벼를 줄기와 뿌리를 1-2 mm정도로 절단면이 비스듬하도록 절단하였다. 2.5% glutaraldehyde로 2-4시간 1차 고정을 한 후 멸균된 증류수로 30분간 3회 반복하여 세척하였다. 1-4% osmium tetroxide로 2-4시간 2차 고정을 한 후 멸균된 증류수로 30분간 3회 반복하여 세척한 후, 25-100% ethanol로 탈수하였다. Hexamethyldisilizane으로 10분간 2회 처리하여 시료의 수분을 완전하게 제거하였다. 시료에 금박을 입힌 후 SEM (S-4300, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

### 균체의 화학분류학적 분석

**Diaminopimelic acid (DAP) 이성질체 분석:** 분리균의 DAP 분석을 위해 tryptic soy broth (TSB)배지에서 1-2주 배양한 후 동결 건조시켰다. 균체를 산 가수분해하고 cellulose TLC plate (5716, Merck, USA)에 표준시료와 시료를 각각 5 μl를 점적하였다. 전개용매는 methanol-water-6N HCl-pyridine (80:26:4:10)을 사용하였으며 발색시약 0.1% ninhydrin을 제조하여 plate에 분무한 후 100°C에서 2분간 가열하였다. DAP의 판정은 표준시료와 전개거리 및 발색으로 비교하였다.

**당 분석:** 동결건조한 균체를 산 가수분해 하고 cellulose TLC plate (Merck)에 표준시료와 같이 5 μl를 점적하였다. 표준시료는 glucose, galactose, arabinose, xylose, ribose를 1% (wt/v)을 제조하여 사용하였다. 전개용매는 ethlyacetate-pyridine-water (100:35:25)였다. 발색시약 aniline:phthalic acid: water-수포화 *n*-butanol (2 ml:3.3 g:100 ml)을 분무한 후 공기 중에서 건조하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 당의 판독은 표준당과의 전개거리와 발색을 비교하여 이루어졌다.

**지방산 분석:** 동결건조한 균체를 알칼리 감화액 (NaOH 15 g, methanol 50 ml, 증류수 50 ml)에서 가수분해시키고 메틸에스테르화 시켰다(6 N HCl 130 ml, methanol 110 ml). 지방산 에스테르는 hexane-*tert*-butylmethyleter를 사용하여 추출하였고 가스크로마토그래피(Agilent Technologies 6890N Network GC System)를 이용하여 분석하였다.

**Menaquinone 분석:** 동결건조 균체와 chloroform-methanol (2:1, v/v)을 섞어 menaquinone을 추출하였다. 건조된 추출물을 acetone으로 녹인 후 역상 TLC plate (Merck HPTLC RF 18 F254)에서 분석하였다. 전개용매는 acetone-water (99:1, v/v)이었으며 시료와 표준시료인 MK-9 ($H_2$), MK-9 ($H_4$), MK-9 ($H_6$), MK-9 ($H_8$)을 전개하고 spot은 단파장 자외선 램프 하에서 확인하였다.

**GC 함량 분석:** TSB배지에서 생장한 균체에서 얻은 정제된 DNA를 HPLC (62NH-013, Hitachi)를 이용하여 GC함량을 분석하였다.

### 항진균활성 검정

분리균주의 항진균활성을 검정하기 위하여 4가지 곰팡이 균주를 단국대학교 김성환 교수로부터 분양 받았다. 이들은 각각 *Fusarium oxysprum* FO-1, *Fusarium solani* FS-1, *Rhizopus oryzae* RO-1, *Trichoderma* sp. T-1 등이다. 분리균주 JK-5는 yeast extract-malt extract agar, tryptone-yeast extract agar (TYE; trypton 5 g, yeast extract 3 g, agar 15 g, 증류수 1 L, pH 7.0-7.2), Hickey and Tresner agar (HT; yeast extract 1 g, beef extract 1 g, casein digest 2 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 g, agar 20 g, 증류수 1 L, pH 7.3), potato dextrose agar (PDA; potato starch 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g, 증류수 1 L)에서 2-7일간 전배양하고 potato dextrose agar에서 1주일 생장한 각기 다른 곰팡이 agar 블럭을 1-2 cm

**Fig. 1.** Colonies of actinomycetes emerging from the surface-sterilized rice roots after 4 weeks incubation.

정도 떨어뜨려서 대치 배양하였다. 1주일 배양한 후 곰팡이 주위에 투명 저지환이 존재하면 항진균활성 양성으로 기록하였다.

### 벼의 발아, 생육 및 내생세균 감염

벼 종자는 외피를 벗겨내고, 70% ethanol에 5분 동안 침지시킨 후 멸균수로 세척한 뒤 멸균된 1.0% NaOCl에서 45분 동안 침지 시킨 후 멸균 증류수에 6번 세척을 하여 표면 소독을 하였다. 표면 소독된 종자는 TSA 평판배지에 치상하여 30°C에서 2일 동안 배양하여 발아를 유도하고, 종자의 오염 여부를 확인하였다. 발아된 벼 종자는 25 ml의 반고체 Murashige와 Skoog 배지가 들어 있는 시험관에 치상하였다. 종자 발아 후 3-5일이 지나 벼 유묘가 최소 5 cm 이상으로 자라면 접종원인 분리균주를 TSB에 24시간 동안 배양한 후 $1\times10^7$ CFU/ml의 농도로 100 µl씩 건전한 벼 유묘 뿌리에 3회 반복하여 접종하였다. 접종 후 28°C에서 3-4주 동안 배양하였으며, 자란 벼를 처음 분리했던 방법과 동일하게 표면살균과 분리배지를 이용하여 재 분리하였다.

## 결과

### 내생 방선균의 분리 및 동정

표면 살균된 벼 뿌리를 두 종류의 분리 배지(TWYE, YECE)상에서 4주 배양 시킨 결과 표면에 방선균 포자 형태를 지닌 균을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 분리균에서 단일 콜로니를 채취하여 순수 배양 후 보관하였다. 보관된 균주를 임의로 JK-5로 명명하였고 그의 16S rDNA 유전자를 콜로니 PCR로 증폭시켜 약 1,500 bp의 염기서열을 결정하였다. 이 염기서열(GenBank ascession number: JF908811)을 가지고 NCBI의 GenBank의 database를 통해 알려진 종의 염기서열과 비교 분석하였다. 그 결과 한 분리균주 JK-5가 *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* NRRL B-1773 (GenBank ascession number: NR 043486)과 일치하는 것으로 판단되어 *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* JK-5로 명명하였다.

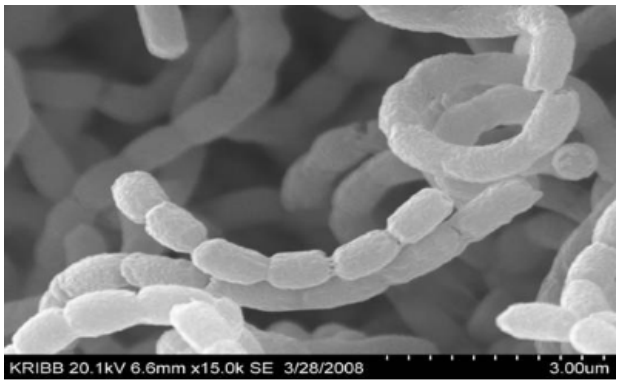


**Fig. 2.** Scanning electron micrography of aerial mycelium of the isolate, *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus* JK-5.

### 형태학적 특성

JK-5 균주의 형태학적 특성은 YEME 고체 평판배지에서 배양하여 2-3주 후에 주사전자현미경으로 관찰하였다. 포자의 형태가 타원형에 가까운 원통형으로 표면은 특이적인 돌출물을 갖고 있지 않는 매끈한 형태이고 굴곡성을 띄면서 연쇄상으로 길게 배열되어 있는 flexible 형태였다(Fig. 2).

### 화학분류학적 특성

JK-5 균주의 세포벽 DAP 이성질체는 LL-DAP이었다. 당 분석에서는 특이한 당 성분이 없었다. 지방산 분석 결과 JK-5 균주는 *Streptomyces*의 전형적인 주요 지방산 구성성분인 anteiso 15:0, anteiso 17:0과 iso-16:0 등이 존재하였다(Table 1). Menaquinone 분석 결과 MK-9 ($H_6$)와 MK-9 ($H_8$)이 주요 성분으로 나타났다. GC 함량을 분석한 결과 JK-5 균주는 72%의 높은 GC 함량을 지니고 있었으며 이는 전형적인 방선균의 특징임을 확인하였다(Table 2).

**Table 1.** Fatty acid compositions of the strain JK-5

| Fatty acids | Composition (%) |
|---|---|
| 15:0 | 1.9 |
| 16:0 | 12.3 |
| iso-14:0 | 2.6 |
| iso-15:0 | 11.4 |
| iso-16:0 | 13.2 |
| iso-17:0 | 5.1 |
| anteiso-15:0 | 29.7 |
| anteiso-17:0 | 12.8 |
| cyclo-17:0 | 1.3 |
| anteiso-17:1 w9c | 1.5 |
| iso-17:1 w9c | 1.6 |
| 16:1 w7c | 2.7 |

**Table 2.** Chemotaxonomic characteristics of the strain JK-5

| Characteristics | JK- 5 |
|---|---|
| Cell wall type | I |
| DAP | LL-DAP |
| Sugar | none |
| Major fatty acid | anteiso-15:0<br>anteiso-17:0<br>iso-16:0 |
| Menaquinone | MK-9(H6) MK-9(H8) |
| GC Mol% | 72 |

### 항진균활성 검정

곰팡이에 대한 분리균주 JK-5의 항진균활성을 검정한 결과 각각의 곰팡이와 배지에 따라 비슷한 양상을 보여주었다. YEME, HT 및 TYE에서는 곰팡이 종류와 관계없이 일정한 수준의 항진균활성을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 PDA 배지에서는 가장 낮은 수준의 항진균활성을 나타내었다. YEME에서 *Trichoderma* sp. 에 대한 높은 항진균활성을 관찰할 수 있었다(Table 3).

### 내생 방선균의 감염능 확인

분리균주 JK-5의 내생성을 확인하기 위해 건전한 벼의 유묘(큰눈벼, 흑진주벼, 백진주벼, 흑선찰벼)에 분리균을 접종하여 재 분리를 하였다. 재 분리한 결과 처음과 동일하게 벼 뿌리 표면에서 방선균 형태의 균들이 나타났다. 또한 JK-5가 침투한 벼 뿌리와 줄기 조직을 SEM으로 관찰한 결과 분리균의 생장이 통기조직과 내피조직에서 활발하게 나타난 것을 확인하였다(Fig. 4).

## 고찰

벼는 전세계의 주요 식량작물로써 그 중요성이 매우 높아 생산성 증대를 위한 연구가 오랜 시간 지속되고 있다. 벼로부터 분리된 내생세균은 농업용 미생물제제 개발 및 유용유전자 발굴을 위한 자원으로 활용할 수 있다(19).

**Fig. 3.** Antifungal activity of the strain JK-5 against the pathogenic fungus, *Fusarium solani* grown on yeast extract malt extract agar plate.

벼 뿌리에서 내생하는 방선균을 분리하여 16S rDNA 염기서열 및 형태학적, 화학분류학적 분석을 실시한 결과 *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus*으로 확인되었다(7). *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* JK-5가 곰팡이에 대하여 항진균활성을 나타냈는데 특히 이 실험에서 사용된 *F. oxisporum* FO-1와 *F. solani* FS-1는 여러 종류의 농작물에서 시들음병을 일으키는 곰팡이 균주이다. *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus*는 non-ribosomal peptide 생합성 유전자를 보유하는 것으로 알려져 있으나(11), 이 항생물질에 의해서 곰팡이의 생장이 저해되었는지는 조사하지 않았다.

한국의 벼에서 분리된 내생세균이 광범위한 항진균활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 즉 내생 *Burkholderia* 균주는 *F. oxysporum*과 *F. solani*외에도 *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Mucor ambiguus*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria* sp., *Phytophthora cactorum* 등에 대해서도 항진균활성이 있었다(18). 내생 *Serratia marcescens*는 *R. solani*와 *Pyricularia grisea*에 대한 항진균활성을 나타내었다(12). 이러한 사실은 내생세균의 항진균 작용이 벼를 비롯한 여러 작물들을 곰팡이 감염으로부터 보호하는 것이 가장 일반적인 생물학적 역할이라는 것과 일치한다(16). 내생세균이 다른 생리활성을 갖고 있는 경우도 있는데 내생 *Burkholderia* 균주는 오이의 생장 촉진 효과를 보였다(18). 중국의 벼에서 분리된 내생 *Rhizobium* 균주는 벼의 생육과 관련된 생리반응을 촉진하며 생장호르몬인 indolacetate와 gibberellins 함량을 높이는 효과를 나타내었다(2). 아직 내생 *Streptomyces* 균주가 벼의 생육을 촉진한다는 보고는 없으나 본 실험에서 얻은 *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* JK-5가 진균성 식물병원균에 대한 항진균활성을 지니고 있는 것으로 보아 곰팡이의 침입으로부터 벼를 보호하며 생육을 촉진 활성도 보유하고 있을 것으로 기대된다.

GFP-표지된 *Rhizobium*이나 GUS-표지된 *Herbaspirillum*을 사용하여 내생세균의 벼 침투 경로를 분석한 보고가 있다(2, 10). 내생세균이 원뿌리와 곁뿌리 경계 부위의 틈을 통하여 벼 조직 내부로 침투하고 줄기나 잎의 내피조직이나 통기조직

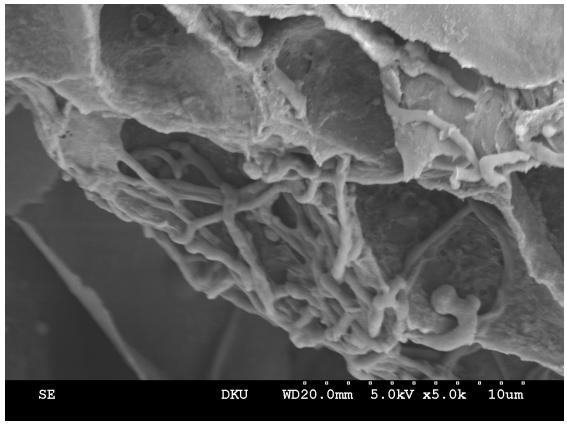


**Fig. 4.** Scanning electron micrograph of the endophytic growth of the strain JK-5 in the root of the rice plant, Keunnunbyeo.

**Table 3.** Antifungal activity of the isolate JK-5 against some pathogenic fungal strains on different media.

| Fungus | Medium | Antifungal activity |
|---|---|---|
| *Fusarium oxysprum* | YEME | ++ |
| | TYE | ++ |
| | HT | ++ |
| | PDA | - |
| *Fusarium solani* | YEME | ++ |
| | TYE | ++ |
| | HT | ++ |
| | PDA | - |
| *Rhizopus oryzae* | YEME | ++ |
| | TYE | ++ |
| | HT | ++ |
| | PDA | - |
| *Trichoderma* sp. | YEME | +++ |
| | TYE | ++ |
| | HT | ++ |
| | PDA | - |

YEME: yeast extract-malt extract agar
TYE: tryptone-yeast extract agar
HT: Hickey and Tresner agar
PDA: potato dextrose agar

에 들어가고 관다발 조직까지 도달한다고 한다. 한국 벼에서 분리된 *Enterobacter* 균주도 GFP (green fluoresence protein)로 표지한 결과 관다발 주위에서 관찰되었다(18). 주사전자현미경을 이용한 결과는 내생 *Enterobacter* 균주가 어린 뿌리의 중심주에 서식함을 보고하였다(16). 본 실험에서도 주사전자현미경 관찰을 통하여 분리균주 JK-5가 통기조직과 내피조직에서 활발한 균사 생장을 하고 있음을 볼 수 있었다.

벼는 다양한 식물 병원균에 의해 일어나는 여러 가지 질병으로 인하여 수확량이 줄어들고 질이 떨어지게 된다. 이러한 벼의 병원균에 대한 항균활성을 보유하는 내생세균을 탐색하고 그 기능을 활용하는 연구가 중요한 과제로 부각되고 있다(9). 앞으로 본 실험에서 분리된 *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus* JK-5도 이러한 측면에서 이용기능성이 있는지 계속 연구할 필요가 있다고 판단된다.

## 적요

천안의 단국대학교 근처에서 채취된 벼 뿌리로부터 내생 방선균 한 주를 분리 동정하였다. 표면 살균된 벼 뿌리를 분리배지 위에 올려 놓고 배양하면 4주 후에 뿌리 표면에 형성된 방선균 콜로니를 볼 수 있었다. 이 중에서 한 균주 JK-5를 분리하여 동정하였다. 16S rDNA 염기서열을 확인한 결과 이 분리균주 JK-5는 *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*와 동일한 균주였다. 형태학적 관찰과 화학분류학적 결과에 의해 분리균주 JK-5의 분류학적 위치를 확인하였다. 기중균사의 형태는 flexible하며 포자사슬은 타원형의 약 30개 정도의 매끄러운 포자로 이루어 졌다. 세포벽은 L,L-diaminopimelic acid를 포함하고 있었다. 당 분석에서는 특이적인 당이 발견되지 않았다. 지방산으로는 anteiso-15:0, anteiso-17:0, iso-16:0가 주요 성분이었다. 퀴논 분석결과 MK-9 ($H_6$)와 MK-9 ($H_8$)이 주요 성분으로 나타났다. GC 함량은 72%로 측정되었다. 식물병원성 곰팡이에 대하여 비교적 높은 항진균활성을 보여주었다. 벼에 감염된 분리균주 JK-5가 뿌리와 줄기에서 균사체를 형성하며 왕성하게 생장하는 것을 SEM을 통하여 확인하였다.

## 감사의 말

본 연구는 2008년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었습니다. 이에 감사드립니다. 또한 많은 조언을 해주신 생명자원센터 배경숙 박사님께 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Barraquio, W.L., L. Revilla, and J.K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194, 15-24.
2. Chi, F., S. Shen, H. Cheng, Y. Jing, Y.G. Yanni, and F.B. Dazzo. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7271-7278.
3. Coombs, J.T. and C.M.M. Franco. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5603-5608.
4. de Araújo, J.M., A.C. da Silva, and J.L. Azevedo. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43, 447-451.
5. Elbeltagy, A., K. Nishioka, H. Suzuki, T. Sato, Y. Sato, H. Morisaki, H. Mitsui, and K. Minamisawa. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 46, 617-629.
6. Engelhard, M., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek. 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2, 131-141.
7. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. Introduction to chemosystematics, pp. 1-15. *In* Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. (eds.), Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press, London, UK.
8. Gyaneshwar, P., E.K. James, N. Mathan, P.M. Reddy, B. Reinhold-Hurek, and J.K. Ladha. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens. J. Bacteriol.* 183, 2634-2645.
9. Hasegawa, S., A. Meguro, M. Shimizu, T. Nishimura, and H. Kunoh. 2006. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica*, 20, 72-81.
10. James, E.K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, Wilfredo L. Barraquio, P.M. Reddy, P.P.M. Iannetta, F.L. Olivares, and J.K. Ladha. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 894-906.
11. Komaki, H., T. Tamura, M. Otoguro, T. Nakashima, and S. Harayama. 2008. Diversity of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Streptomyces* preserved at NBRC. Unpublished data.

12. Lee, S.K., W.Y. Song, and H.M. Kim. 2004. Isolation and identification of rice root endophytic antagonistic. *Res. Plant Dis*. 10, 63-68.
13. Mano, H., F. Tanaka, C. Nakamura, H. Kaga, and H. Morisaki. 2007. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa* L.) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ.* 22, 175-185.
14. Mano, H. and H. Morisaki. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environ*. 23, 109-117.
15. Mattos, K.A., V.L.M. Padua, A. Romeiro, L.F. Hallack, B.C. Neves, T.M.U. Ulisses, C.F. Barros, A.R. Todeschini, J.O. Previato, and L. Mendonca-Previato. 2008. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiensis* and its ability to enhance plant growth. *An. Acad. Bras. Cienc*. 80, 477-493.
16. Mukhopadhyay, K., K.N. Garrison, D.M. Hinton, C.W. Bacon, G.S. Khush, H.D. Peck, and N. Datta. 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia* 134, 151-159.
17. Naik, B.S., J. Shashikala, and Y.L. Krishnamurthy. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiol. Res.* 164, 290-296.
18. Park, S.Y., S.H. Yang, S.K. Choi, J.G. Kim, and S.H. Park. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from rice root cultivated in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*. 35, 1-10.
19. Rosenblueth, H.M. and E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19, 827-837.
20. Sessitsch, A., B. Reiter, U. Pfeiferand, and E. Wilhelm. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Ecol*. 39, 23-32.
21. Sun, L., F. Qiu, X. Zhang, X. Dai, X. Dong, and W. Song. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* 55, 415-424.