

水稻革兰氏阳性细菌的主要种群结构及对纹枯病和恶苗病菌的拮抗性

李斌¹ 谢关林^{1,*} 吕意琳¹ 郝晓娟¹ 罗金燕¹ 刘波² 李雯¹

(¹浙江大学水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310029; ²福建省农业科学院生物技术中心, 福建 福州 350003; *通讯联系人, E-mail: glxie@zju.edu.cn)

Community Composition of Gram-Positive Bacteria Associated with Rice and Their Antagonists Against the Pathogens of Sheath Blight and Bakanae Disease of Rice

LI Bin¹, XIE Guan-lin^{1,*}, LU Yi-lin¹, HAO Xiao-juan¹, LUO Jin-yan¹, LIU Bo², LI Wen¹

(¹State Key Laboratory of Rice Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Center of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; *Corresponding author, E-mail: glxie@zju.edu.cn)

Abstract: A survey on screening and identification of gram-positive bacteria was conducted during 1998 - 2004. Seven hundred and fifty-six rice samples were collected from Zhejiang, Jiangsu, Fujian and Yunnan Provinces, China. Over 1000 bacterial isolates were isolated and tested with colony morphology, pathogenicity, and some characteristics of bacteriology including Gram staining, fluorescent pigment on Kings medium B and microscopic observation for endospore. Together with 5 standard reference strains, 74 representative gram-positive bacterial isolates were confirmed by Biolog and gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. Five bacterial species of *Bacillus* and other 3 genera were identified and the isolates from *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* exhibited the most effective inhibition against the pathogens of sheath blight and bakanae disease of rice. A few isolates from *Bacillus pumilus* and *Bacillus megaterium* showed weak virulent on rice together with some virulent isolates, risk should be considered when isolates from these species were screened for biocontrol agents.

Key words: bacterial identification; bacterial population; antagonistic bacteria; sheath blight; bakanae disease

摘要: 于1998~2004年对采自浙江、江苏、福建和云南省的756份稻株和稻种样本进行了革兰氏阳性细菌的分离、鉴定研究。被分离的1015个菌株经致病性测定、菌落形态及部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB培养基上的荧光色素及芽孢的染色镜检等)测定后,选出代表菌株74个连同5个对照菌株用Biolog及脂肪酸分析法(FAME)进行测试,鉴定出*Bacillus*属5个种及其他3属的革兰氏阳性细菌,并发现枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌菌株具有很好的纹枯病和恶苗病拮抗能力,但来自短小芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌的极少数菌株在条件适宜时能与其他病原菌一起引起水稻褐斑,从这些种筛选生防菌株时应充分考虑其风险。

关键词: 细菌鉴定; 细菌种群; 拮抗细菌; 纹枯病; 恶苗病

中图分类号: Q939.92; S432.4; S476

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)01-0084-05

水稻(*Oryza sativa* L.)是最重要的粮食作物之一,也是世界1/2人口的主食。利用抗性品种和多项措施把有害生物控制在经济允许的损失范围之内是目前水稻有害生物综合治理的核心,其中利用生防细菌进行水稻病害防治是重要的措施之一。水稻上虽然存在不少致病细菌^[1],但更多的还是非致病细菌,这些与水稻相关的非致病细菌种群为水稻病害的生物防治提供了丰富的资源。了解水稻上的细菌种群组成是利用拮抗细菌进行生物防治的关键一步。目前国内外对革兰氏阴性细菌研究较多,而对革兰氏阳性细菌的研究主要局限于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),如枯草芽孢杆菌 B916 已成功应用于我国的水稻纹枯病防治^[2,3]。然而,目前我国主要稻区水稻上革兰氏阳性细菌的种群组成、致病

性以及其主要水稻病原真菌的拮抗效果还没有系统的研究。本研究拟破解我国主要稻区水稻上革兰氏阳性细菌主要种类及它们对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)和恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)的拮抗性,为进一步开发和利用水稻生防细菌提供信息和物种资源。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

5个标准细菌菌株分别由比利时根特大学国家

收稿日期: 2005-03-11; 修改稿收到日期: 2005-04-05。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270891); 国家863计划资助项目(2002AA241261); 中国-比利时政府合作项目。

第一作者简介: 李斌(1978-),男,博士。

菌种收藏中心(LMG)和国际水稻研究所(IRRI)提供(表1)。4个来源于蔬菜和水稻土壤的生防细菌菌株(B2,B5,B7和B8)^[4]以及水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)和恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)由浙江大学生物技术研究所提供。

1.2 样本采集与细菌分离

1998~2004年,于水稻分蘖期和孕穗期采集叶片和叶鞘,灌浆期采集叶片、叶鞘和谷粒,乳熟期和蜡熟期从田间直接采集谷粒或收割时取有代表性的稻种每份50~250g。在浙江稻区获得稻种606份,江苏11份,福建8份,云南6份,共计631份;水稻生长期从浙江、福建和云南稻区分别采集稻株样本117份、4份和4份。各稻区所采样本均为单季晚稻。稻株细菌的分离采用直接研碎分离法^[5],稻种细菌的分离主要采用直接研碎分离和发芽分离^[6]等方法。

1.3 致病性测定

感病品种IR8的种子用70%酒精处理1min后用蒸馏水洗净,稀植于盆钵中。土壤为未种过水稻的深层土,管理方法同常规但偏施氮肥,生长4周后的秧苗待用。将所测细菌菌株配成大约 1×10^8 个/mL的悬浮液体,在茎基部由下而上注射秧苗,每株苗0.6mL,保湿1d。3d后开始观察发病情况。离体稻叶接种参照Xie等^[7]的方法。

1.4 细菌的鉴定

1.4.1 革兰氏染色和菌落形态鉴定

菌落形态和部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB培养基上的荧光色素和芽孢的染色镜检等)测定参照Schaad等^[8]方法。分离的水稻相关细菌在TSA培养基^[5]上经过单菌落培养后,根据革兰氏染色反应和荧光色素测定排除产荧光假单胞等革兰氏阴性菌。革兰氏阳性菌主要通过菌落形态及是否产生芽孢把*Bacillus*菌与其他菌相区别。进行菌落形态和部分细菌学特征测定时与可能的标准对照菌株作比较,把它们初分成几个类群,每类型中选出有代表性的细菌菌株供Biolog和脂肪酸分析法(FAME)鉴定,没有标准对照菌株的类群以Biolog和FAME鉴定中具有最高相似性的菌株作为辅助对照菌株。

1.4.2 Biolog 鉴定

从上述菌株中获得74个典型革兰氏阳性细菌(GP)进行Biolog鉴定。各菌株在TSA平板上培养24h,用无菌生理盐水配制细菌悬浮液,将菌体数调节为约 5×10^8 个/mL(OD值0.25)。在含95个碳

源的Biolog(Biolog Inc.,Investment Blvd.3447,Suite 3 Hayward 94545,USA)GP微孔板中每孔加入150 μ L被测细菌悬浮液,30 $^{\circ}$ C下培养24h,观察并记录各孔颜色反应情况,用Biolog专用细菌鉴定程序(4.01版本)分析并确定菌株的属种。

1.4.3 脂肪酸分析法(FAME)鉴定

所有纯化的参试菌株先在NA培养基上于28 $^{\circ}$ C下生长24h后,转入含3%胰蛋白酶的TSA固体培养基上再培养24h。然后用直径4mm的无菌塑料接种环挑取一环培养菌放入有螺帽的试管中,提取脂肪酸^[9]。FAME的指纹图谱由5980a型脂肪酸分析仪分析,鉴定结果通过专门的微生物鉴定系统软件MIS 4.15版本(Microbial ID Inc.,Newark DE)获得。

1.5 离体拮抗真菌测定

用双向平板对峙法分别对来自水稻的63个(11个弱致病菌株除外)典型细菌菌株以及4个来自于土壤的革兰氏阳性菌进行了拮抗水稻纹枯病菌(*R. solani*)及恶苗病菌(*F. moniliforme*)的测试。所测细菌菌龄为24h,*R. solani*及*F. moniliforme*的菌龄为48h,细菌与病原真菌在PDA平板上28 $^{\circ}$ C下培养48h后,测量拮抗细菌的抑菌圈大小,计算抑菌率,每处理重复3次。

2 结果与分析

2.1 水稻相关革兰氏阳性细菌的分离

通过TSA培养测定,从收集的水稻样品上共分离获得革兰氏阳性菌1015株。选出74个典型菌株作进一步分析,其中浙江省稻种上46株,稻叶、叶鞘上9株;江苏省稻种上8株;福建省稻叶和稻种上共6株;云南省稻叶和稻种上共5株(表1)。这些分离物在KMB培养基上均不产生荧光,也没有扩散性色素。致病性测定显示绝大部分的菌株都是水稻非致病菌,但同时发现从浙江省稻种上分离的11个细菌菌株具有弱致病性,在适宜的环境条件下,这些菌株在与水稻病原菌一起发生时增强致病细菌发病的趋势,虽然这些弱致病力种仅有2%~3%左右的菌株在稻叶鞘上产生短小的褐斑或出现加重其他细菌病害的趋势,但在利用来自这些种群的菌株作为生防制剂时仍应考虑其风险。

2.2 水稻相关革兰氏阳性细菌的鉴定

2.2.1 革兰氏阳性细菌鉴定方法的可靠性

为保证水稻相关细菌鉴定方法的可靠性,对来自比利时和国际水稻研究所的3个标准革兰氏阳性

表 1 水稻相关的革兰氏阳性细菌的分离与特征化

Table 1. Isolation and characterization of gram positive bacteria associated with rice.

原始编号 Original no.	来源 Origin	分离部位 Isolation position	测定菌株数 No. of strains tested	革兰氏染色 Gram staining	致病性测定 Pathogenicity test
B97010	LMG	稻种 Rice seed	1	+	A
B97012	LMG	稻种 Rice seed	1	+	A
II1342	IRRI	稻种 Rice seed	1	+	A
IR01806	IRRI	稻种 Rice seed	1	-	V
IR10707	IRRI	稻种 Rice seed	1	-	A
CB96201, 96205, 98200, 98206, 98207	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	5	+	W
CB96233, 96236, 98255, 98261, 98266, 98269	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	6	+	W
S98011-S98012	江苏 Jiangsu, China	稻种 Rice seed	2	+	A
S99031-S99032	江苏 Jiangsu, China	稻种 Rice seed	2	+	A
S00041	江苏 Jiangsu, China	稻种 Rice seed	1	+	A
S01044-S01046	江苏 Jiangsu, China	稻种 Rice seed	3	+	A
S98211-S98216	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	6	+	A
S98221-S98225	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	5	+	A
S00211-S00212	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	2	+	A
S00241-S00244	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	4	+	A
S01251-S01254	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	4	+	A
S03261-S03271	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	11	+	A
S04291-S04293	浙江 Zhejiang, China	稻种 Rice seed	3	+	A
S23780, T26511, S40005, Y40084	浙江 Zhejiang, China	稻叶, 叶鞘 Leaf, sheath of rice	4	+	A
T16436, T16439, Y28336, S33655, S40011	浙江 Zhejiang, China	稻叶, 叶鞘 Leaf, sheath of rice	5	+	A
T00311-T00314	福建 Fujian, China	稻株, 稻种 Plant, seed of rice	4	+	A
T01321-T01322	福建 Fujian, China	稻株, 稻种 Plant, seed of rice	2	+	A
T99431-T99433	云南 Yunnan, China	稻株, 稻种 Plant, seed of rice	3	+	A
T00451-T00452	云南 Yunnan, China	稻株, 稻种 Plant, seed of rice	2	+	A

W - 弱致病; V - 致病; A - 不致病。

W, Weak virulent; V, Virulent; A, Avirulent.

细菌和 2 个革兰氏阴性细菌菌株进行了再鉴定。发现这些菌株的当前鉴定结果与原鉴定基本一致(表 2)。细菌菌株经致病性、菌落形态及部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB 培养基上的荧光色素和芽孢的染色镜检等)测定后基本能决定其归属。但种的快速鉴定须借助由计算机辅助的 Biolog 与 FAME 鉴定方法。3 个标准阳性菌株的 Biolog 和 FAME 图谱与计算机数据库中存在的对照菌株的相似性分别在 0.64 以上和 0.70 以上,表明这两种方法能够应用于革兰氏阳性细菌的快速鉴定。

2.2.2 水稻相关革兰氏阳性细菌的种类

Biolog 和 FAME 鉴定结果显示从浙江省水稻稻株上分离的革兰氏阳性细菌主要为枯草芽孢杆菌和萎蔫短小杆菌一品红致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*)。福建省稻株和稻种上分离的阳性菌主要为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus*

cereus)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。云南省稻株和稻种上分离的阳性菌主要为枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。浙江省水稻稻种上分离的阳性菌主要为枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、短短小芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌和液化金杆菌(*Microbacterium liquefaciens*)。来自浙江省水稻种子上的细菌种类相对比较多样,这可能与所采集样品数量多、来源广有关。

2.3 水稻相关革兰氏阳性细菌对水稻纹枯病及恶苗病的抑菌率

对用 Biolog 与 FAME 鉴定的部分典型菌株进行了纹枯病菌及恶苗病菌的抑菌率测定,结果如表 3 所示。在鉴定出的 4 个属中,液化金杆菌菌株的拮抗能力最弱,芽孢杆菌菌株和短短小芽孢杆菌菌

表2 水稻相关革兰氏阳性菌的 Biolog 及脂肪酸(FAME) 鉴定

Table 2. Biolog and FAME identity of gram positive bacteria associated with rice.

原始编号 Original no.	细菌种或型 Species or type	Biolog 相似性 Biolog similarity	脂肪酸相似性 FAME similarity
B97010	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.68	0.71
B97012	<i>Bacillus megaterium</i>	0.66	0.70
I11342	<i>Bacillus subtilis</i>	0.64	0.75
IR01806	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	0.73	0.84
IR10707	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.88	0.50
CB96201, 96205, 98200, 98206, 98207	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.60 ~ 0.70	0.61 ~ 0.70
CB96233, 96236, 98255, 98261, 98266, 98269	<i>Bacillus megaterium</i>	0.61 ~ 0.71	0.59 ~ 0.73
S98011-S98012	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.53 ~ 0.68	0.53 ~ 0.66
S99031-S99032	<i>Bacillus megaterium</i>	0.50 ~ 0.66	0.48 ~ 0.63
S00041	<i>Bacillus pumilus</i>	0.57 ~ 0.65	0.56 ~ 0.65
S01044-S01046	<i>Bacillus subtilis</i>	0.65 ~ 0.71	0.67 ~ 0.75
S98211-S98216	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.53 ~ 0.66	0.53 ~ 0.66
S98221-S98225	<i>Bacillus cereus</i>	0.51 ~ 0.67	0.52 ~ 0.69
S00211-S00212	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.51 ~ 0.63	0.50 ~ 0.65
S00241-S00244	<i>Bacillus megaterium</i>	0.50 ~ 0.70	0.60 ~ 0.79
S01251-S01254	<i>Bacillus pumilus</i>	0.57 ~ 0.67	0.57 ~ 0.70
S03261-S03271	<i>Bacillus subtilis</i>	0.65 ~ 0.71	0.49 ~ 0.89
S04291-S04293	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	0.51 ~ 0.70	0.48 ~ 0.69
S23780, T26511, S40005, Y40084	<i>Bacillus subtilis</i>	0.70 ~ 0.75	0.69 ~ 0.73
T16436, T16439, Y28336, S33655, S40011	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poini</i> B	0.43 ~ 0.56	0.42 ~ 0.52
T00311-T00314	<i>Bacillus cereus</i>	0.51 ~ 0.72	0.52 ~ 0.71
T01321-T01322	<i>Bacillus megaterium</i>	0.50 ~ 0.72	0.58 ~ 0.78
T99431-T99433	<i>Bacillus pumilus</i>	0.57 ~ 0.74	0.58 ~ 0.72
T00451-T00452	<i>Bacillus subtilis</i>	0.68 ~ 0.71	0.49 ~ 0.79

表3 部分水稻革兰氏阳性菌对水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 及恶苗病菌 *Fusarium moniliforme* 的抑菌作用Table 3. Antagonistic effect of some gram positive bacteria associated with rice against sheath blight (*Rhizoctonia solani*) and bakanae disease (*Fusarium moniliforme*) of rice.

原始编号 Original no.	测定菌株数 No. of strains tested	对纹枯病菌的抑菌率 Inhibition rate to <i>R. solani</i> / %	对恶苗病菌抑菌率 Inhibition rate to <i>F. moniliforme</i> / %
S98011-S98012	2	13.3	8.7
S99031-S99032	2	20.0	15.2
S00041	1	10.3	8.2
S01044-S01046	3	18.5	11.2
S98211-S98216	6	7.7	3.6
S98221-S98225	5	11.0	0.0
S00211-S00212	2	5.3	4.2
S00241-S00244	4	16.2	14.8
S01251-S01254	4	8.7	8.1
S03261-S03271	11	21.2	5.3
S04291-S04293	3	3.2	3.2
S23780, T26511, S40005, Y40084	4	25.5	20.3
T16436, T16439, Y28336, S33655, S40011	5	10.5	6.7
T00311-T00314	4	9.1	1.5
T01321-T01322	2	15.0	14.8
T99431-T99433	3	11.6	9.7
T00451-T00452	2	21.2	8.7
B2, B5, B7, B8	4	17.8	8.3

株对纹枯病菌及恶苗病菌都有较强的抑制作用, 萎蔫短小杆菌菌株虽也具拮抗能力, 但鉴于其可能是病原的风险, 不适宜作为生防菌利用。来自于不同地方、不同水稻部位的枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌菌株整体上显示了最大的纹枯病菌及恶苗病菌抑

制, 虽然这些菌株整体上对恶苗病菌显示了较好的抑制效果, 但抑制率明显低于对纹枯病菌的抑制率。另外, 从土壤中分离获得的 3 株枯草芽孢杆菌 (B5、B7 和 B8) 和 1 株短小芽孢杆菌 (B2) 对水稻两种病原也具有不同程度的拮抗作用。

3 讨论

水稻相关细菌的研究通常集中于病原菌鉴定与拮抗菌的筛选上,而忽略了大量的腐生的机遇性和共生细菌。浙江晚稻稻种非致病细菌的多样性已有报道^[6],但尚没有系统地对水稻相关革兰氏阳性细菌种群的研究。作者在过去 7 年间先后从来自浙江、江苏、福建和云南稻区的稻株和稻种样本上分离出 1015 个革兰氏阳性细菌菌株。虽然 Biolog 和 FAME 鉴定具有较准确和快速的优点,但成本也较高,不可能对分离到的千余个菌株都进行这些鉴定,只能先利用菌落形态、致病性及传统的细菌学测定法,把它们初分成几个类群,从中选出有代表性的菌株 74 个连同 5 个标准菌株进行了 Biolog 和 FAME 鉴定。而大多数菌株是通过传统鉴定方法(致病性测定、菌落形态及部分细菌学特征测定)区来分细菌的主要类群。

与热带环境下水稻种子相关革兰氏阳性细菌的种类^[10]相比,我国部分稻区水稻上的革兰氏阳性菌主要为芽孢杆菌属类,其他属的细菌很少,这可能是由于生态环境的不同。芽孢杆菌是目前主要的生防菌之一^[2,3,11],本研究分离到的一些芽孢杆菌菌株对水稻纹枯病菌及恶苗病菌有较好的抑制作用,但不同种、不同菌株间的抑菌率存在较大差异。与分离于水稻上的菌株一样,来自于土壤中的两种革兰氏阳性细菌也能抑制水稻上的这两种病原真菌,显示了拮抗作用的机制可能是产生了某种相同性质的抗生物质。在浙江省水稻稻株上分离的 5 株细菌被鉴定为萎蔫短小杆菌一品红致病变种,可能需要进一步确认,这是由于该细菌的 Biolog 与 FAME 鉴定相似性都比较低,而该细菌又是一种植物致病菌,在我国尚未发生。此外,鉴定结果还显示一些对水稻弱致病性的菌株如短短小芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌,这两个种的菌株广泛存在于我国水稻上,甚至一些还被筛选作为植物拮抗菌应用于生产,虽然大部分菌株都不致病,但对它们的安全性需要引起重视。

水稻上发现的液化金杆菌和萎蔫短小杆菌作为与水稻相关细菌的意义还不清楚,但这些种群不应当被忽略。萎蔫短小杆菌可能存在致病性的风险,而液化金杆菌是一个未知机遇性病原还是一个未开发的有益细菌资源仍有待研究。同时在选择有潜力的生防菌株时应重视一些非致病种的极少数菌株在

一定条件下能和病原菌一起加重水稻病害的现象。我们的研究仅仅是这一领域工作的开端,与水稻相关细菌特别是革兰氏阳性细菌有益菌种类和功能方面的研究尚需加强。目前自然界中只有 1%~5% 的微生物被分离培养和描述^[12],由于鉴定技术和人工培养问题,许多细菌种类尚未被分离和鉴定,研究中还发现一些菌株无法用一般的方法加以鉴定,有待寻求其他准确快速的鉴定方法。

谢辞:通讯作者 1998~2004 年的研究生参加部分工作,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 谢关林,朱国念,任小平. 浙江水稻稻种病原细菌多样性研究. 植物病理学报, 2002, 32(2):114-120.
- [2] 陈志谊,许志刚,高泰东,等. 水稻纹枯病拮抗菌的评价与利用. 中国水稻科学, 2000, 14(2):98-102.
- [3] 李湘民,胡白石,许志刚,等. 拮抗细菌 *Bacillus subtilis* B5423-R 抑制水稻纹枯病的阈值群体数量. 中国水稻科学, 2003, 17(4):360-364.
- [4] Li B, Xie GL, Soad A, et al. Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. *J Zhejiang University Science: B*, 2005, 6(6):496-501.
- [5] Mew T W, Misra J K. A Manual of Rice Seed Health Testing. Manila: International Rice Research Institute, 1994: 29-46.
- [6] 谢关林, Mew T W. 浙江晚稻稻种非致病细菌多样性初步研究. 生物多样性, 2002, 10(3):311-317.
- [7] Xie GL, Mew T W. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from rice seed. *Plant Dis*, 1998, 82(9):1007-1011.
- [8] Schaad N W, Jones J B, Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 2001: 250-260.
- [9] Vauterin L, Yang P, Swings J. Utilization of fatty acid esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 46:298-304.
- [10] Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, et al. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, 2001, 91(3):282-292.
- [11] 赵新华,陈卫良,李德葆. 白叶枯病菌拮抗菌筛选及水稻叶围微生物互作研究初报. 中国水稻科学, 2000, 14(3):161-164.
- [12] Amann R I, Ludwig W, Scliefer K H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59:143-169.