

Artur Piński<sup>1</sup>, Katarzyna Hupert-Kocurek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w marcu 2016 r.  
Zaakceptowano w maju 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Genetyczne uwarunkowania kolonizacji rośliny przez endofity bakteryjne. 3. Genetyczne podłoże odporności bakterii endofitycznych na stres oksydacyjny i osmotyczny. 4. Mechanizmy sekrecji i translokacji białek efektorowych. 5. Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w interakcje endofit bakteryjny-gospodarz. 6. Zmiany w ekspresji genów w interakcji endofit bakteryjny-roślina. 7. Podsumowanie

#### Genetic basis of endophytic bacteria-plant interactions

**Abstract:** Bacterial endophytes promote plant growth through colonization of the internal tissues of the plant without external signs of infection or negative effects on their host. Although endophytic bacteria enter the plant through the primary and lateral root hair cells, root cracks and wounds, they are found at many sites in the plants, such as stems, leaves, seeds, and xylem. The colonization of plant tissues comprises: host recognition, chemotactic migration of endophyte towards root exudates, adhesion to the surface of the root, penetration of the epidermis and finally adaptation to a new environment. The distinctive features of endophytic bacteria are their flagellar motility, secretion of the cell-wall degrading enzymes (CWDEs) and biofilm-forming ability. It is postulated that endophytic bacteria capable of colonizing plants should contain at least a minimum set of genes responsible for their endophytic behavior. Among them, genes involved in chemotaxis and adhesion processes, secretion and translocation of effector proteins as well as genes which facilitate survival in reactive-oxygen rich environment can be distinguished. An important group of genes are the ones which encode regulatory proteins involved in the control of gene expression at the transcriptional level. However, in establishing an endophytic association with plants, species-specific gene-functions seem to be involved. Identification of genes responsible for endophytic behavior will increase our knowledge about the genetic aspects of plant-endophyte interactions and enable to fully exploit their potential.

1. Introduction. 2. Genetic determinants of plant colonization by bacterial endophytes. 3. The genetic basis of endophytic bacteria resistance to oxidative and osmotic stress. 4. Mechanisms of secretion and translocation of effector proteins. 5. Transcription factors involved in the interactions of bacterial endophytes with the host. 6. Changes in gene expression in the plant-endophyte interactions. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bakterie endofityczne, białka efektorowe, kolonizacja rośliny  
**Key words:** endophytic bacteria, effector proteins, plant colonization

## 1. Wprowadzenie

Endofity bakteryjne, to pochodzące głównie z ryzo-sfery, bakterie kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin, niewywołujące objawów chorobowych [14]. Bakterie te mogą wnikać do rośliny poprzez włosniki, korzenie, jak również poprzez przetchlinki czy aparaty szparkowe [34]. Mogą dostawać się do wnętrza rośliny przez uszkodzenia wywołane czynnikami abiotycznymi lub enzymami degradującymi ściany komórkowe (CWDE – Cell Wall Degrading Enzymes) [19]. Endofity mogą pozostawać w miejscu wniknięcia do rośliny lub migrować poprzez jej system waskularny lub apoplast [36].

Zdolność bakterii do kolonizacji rośliny i oddziaływań endofitycznych z gospodarzem związana jest z genetycznym uwarunkowaniem ruchliwości, zdolności do adhezji do powierzchni korzenia i penetracji tkanek gospodarza, utrzymania potencjału redoks, jak również sekrecji i transportu substancji odżywczych. Ważną grupę genów stanowią geny kodujące białka

regulatorowe zaangażowane w kontrolę ekspresji genów na poziomie transkrypcji [2]. Cechy bakterii niezbędne w procesie kolonizacji rośliny i oddziaływań endofitycznych z gospodarzem przedstawiono w tabeli I.

## 2. Genetyczne uwarunkowania kolonizacji rośliny przez endofity bakteryjne

Proces kolonizacji rośliny zwykle rozpoczyna się od rozpoznania przez bakterie endofityczne specyficznych związków wydzielanych przez roślinę i migrację w kierunku ich źródła. Zdolność do przemieszczania się w kierunku bodźca chemicznego zwana jest chemotaksją dodatnią. Proces ten został szczegółowo poznany i opisany u *Escherichia coli* [31]. W odpowiedzi na pojawienie się w środowisku danego związku, chemiczny ligand zostaje rozpoznany przez zlokalizowany na powierzchni komórki chemoreceptor MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein). Związanie

\* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 462, email: katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl

Tabela I  
Cechy warunkujące zdolność bakterii do kolonizacji i oddziaływań endofitycznych z rośliną

Zdolność do ruchu	rzęski, pilusy typu IV
Adhezja do powierzchni korzenia, tworzenie biofilmu	rzęski, pilusy typu IV, egzopolisacharydy, lipopolisacharydy, hemaglutyniny/hemolizyny, włókna curli
<i>quorum sensing</i>	synteza AHL, receptory specyficzne dla AHL
Zdolność degradacji ściany komórkowej roślin	pektynazy, celulazy, proteazy
Odporność na stres oksydacyjny	katalaza, peroksydaza, transferaza S-glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa, pompy typu RND, synteza i degradacja PHB
Sekrecja i translokacja białek efektorowych	systemy sekrecji typu I–VI, system Sec i Tat

liganda powoduje wzbudzenie sygnału przesyłanego przez szereg białek chemotaktycznych (Che) na złożony kompleks białkowy rzęski. Jednym z chemotaktycznych białek zaangażowanych w przesyłanie sygnału jest kinaza histydynowa, CheA. Białko to, ulegając autofosforylacji, przesyła grupę fosforanową na białko CheY regulujące aktywność systemu oddziałującego bezpośrednio z flagellum, kontrolującego kierunek rotacji wici. Do grupy białek warunkujących przesyłanie sygnału i chemotaktyczny ruch bakterii w komórkach *E. coli* należą także: białko CheW modulujące aktywność CheA, metylotransferaza CheR i esteraza metylowa CheB katalizujące metylację MCP [31]. Obecność genu *chsA* kodującego białko CheA, jak również aktywność tego enzymu wykazano w komórkach endofitycznego szczepu *Azospirillum brasilense*. Badania Pedraza i wsp. [32] obejmujące mutagenezę i klonowanie genu *chsA* oraz izolację i charakterystykę białka CheA potwierdziły jego udział w chemotaktycznej odpowiedzi szczepu.

Ruchliwość jest jedną z ważniejszych cech bakterii endofitycznych umożliwiającą efektywną kolonizację rośliny. Bakterie te mogą przemieszczać się ruchem biernym, zgodnym z przepływem wody w roślinie, lecz aktywna ruchliwość umożliwia im niezależne przemieszczanie się w obrębie tkanek gospodarza. Zdolność endofitów bakteryjnych do ruchu wynika z obecności genów kodujących rzęski lub pilusy typu IV odpowiedzialne za drgający ruch komórek. Badania Mitter i wsp. [13] wykazały, że ruch drgający komórek uwarunkowany obecnością pilusów typu IV jest niezbędny do kolonizacji ryżu przez endofityczną bakterię *Azoarcus* sp. BH72. W komórkach szczepu BH72, synteza tego typu pilusów jest związana z obecnością genu *pilA*, kodującego krótki peptyd – prepilinę i genu *pilB*, kodującego białko niezbędne w procesie syntezy pilusów. Oba geny tworzą operon *pilAB* i są równocześnie transkrybowane. W komórkach szczepu *Azoarcus* sp. BH72 wykazano także obecność dodatkowego genu *pilT*, kodującego białko o aktywności ATPazy, odpowiedzialne za retrakcję pilusa typu IV warunkującą przesunięcie komórki [7]. Mutacja w obrębie genu *pilT*, kodującego białko PilT powoduje, że szczep BH72 tworzy mikrokolonie na powierzchni korzeni ryżu, lecz

jego zdolność do inwazji i kolonizacji tej rośliny jest znacznie upośledzona.

Kolejny, kluczowy etap kolonizacji rośliny przez bakterie polega na adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni korzenia i ich intensywnych podziałach skutkujących utworzeniem biofilmu. Tworzenie biofilmu przez bakterie, jak i szereg procesów, takich jak: replikacja DNA, biosynteza metabolitów wtórnych czy bioluminescencja, ulega regulacji poprzez mechanizm *quorum sensing* (QS). U bakterii Gram-ujemnych, cząsteczkami sygnałowymi odpowiadającymi za QS, są najczęściej acylowe pochodne laktonu homoseryny (AHL). Cząsteczki te wydzielane są do środowiska, a gdy ich stężenie przekroczy wartość progową, następuje zmiana ekspresji genów we wszystkich komórkach danej populacji. Jak wykazały badania Dourado i wsp. [11], u endofitycznych bakterii z rodzaju *Methylobacterium* zagęszczenie komórek, a co za tym idzie, produkcja AHLs ma większy wpływ na ekspresję genów związanych z interakcjami pomiędzy bakteriami a gospodarzem, niż wydzieliny roślinne. Cząsteczki AHL zwiększają ekspresję genów związanych z metabolizmem bakterii (*mxoF*), adaptacją bakterii do stresu środowiskowego (*crtI*, *sss*) oraz reakcją bakterii na wydzieliny roślinne (*acdS*). W komórkach tych mikroorganizmów, w obecności wydzieliny roślinnych, jedynie gen *mxoF* ulega zwiększonej ekspresji. Zdolność do produkcji specyficznego laktonu, OOHL (lakton N-3-oksyoctanylo-L-homoseryny), wykazano w komórkach *Pantoea agglomerans* YS19. Ta endofityczna, diazotroficzna bakteria wyizolowana z ryżu, zdolna jest do tworzenia wielokomórkowych agregatów zwanych symplazmatami. Choć YS19 wnika do tkanek gospodarza w postaci pojedynczych komórek, to kolonizacja zachodzi w postaci symplazmat [53]. Badania Jiang i wsp. [17] wykazały, że inkubacja komórek *P. agglomerans* YS19 w pożywce z dodatkiem OOHL zwiększa ich zdolność do kolonizacji gospodarza o około 67%. W badaniach obserwowano również wzrost średniej świeżej masy siewek ryżu o 11,8%. Obserwowane efekty mogą wynikać z intensywniejszego tworzenia symplazmat i zwiększonej zdolności do ruchu komórek promowanej przez OOHL.

Wytwarzanie AHL nie zawsze wpływa na efektywność kolonizacji rośliny przez bakterie. Badania z użyciem laktonazy rozkładającej acylowe pochodne laktonu homoseryny produkowanej przez endofityczny szczep *Azospirillum lipoferum* B518, wykazały, że enzymatyczna dezaktywacja AHLs powoduje zanik aktywności pektynaz, zwiększoną syntezę sideroforów oraz zmniejszoną syntezę kwasu indoliloctowego (IAA). Nie obserwowano natomiast żadnych zmian w aktywności celulaz czy zdolności szczepu do poruszania się. Wyniki opisanych badań sugerują, że regulacja ekspresji genów istotnych dla kolonizacji rośliny, jak i promocji wzrostu gospodarza przez QS są specyficzne dla danego szczepu bakterii [6].

Wstępny etap kolonizacji rośliny – adhezję bakterii do korzenia, warunkują słabe odwracalne oddziaływanie międzycząsteczkowe. Kolejna faza oddziaływań jest nieodwracalna i wynika z oddziaływań między powierzchnią korzenia a fimbriami lub flagellami mikroorganizmu [34]. W *A. brasilense* Sp7, wici są niezbędne nie tylko do chemotaktycznego przemieszczania się bakterii w kierunku korzenia, ale także w początkowym etapie adhezji komórek i ich trwałym zakotwiczeniu. Mutanty badanego szczepu niewytwarzające wici nie wykazują zdolności do kolonizacji gospodarza [44]. Obniżoną zdolność do tworzenia biofilmu i poruszania się wykazywał także niezdolny do syntezy wici mutant szczepu *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [5].

Zakotwiczenie endofitów bakteryjnych na powierzchni korzenia gospodarza, może być również związane z obecnością zewnątrzkomórkowych białek lub polimerów otoczkowych [34]. Włókna curli to główny białkowy składnik macierzy zewnątrzkomórkowej u wielu szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Włókna te zaangażowane są w procesy adhezji komórek do powierzchni korzenia, agregacji komórek bakteryjnych i formacji biofilmu. W genomie szczepu *Pseudomonas putida* W619 zlokalizowano dwa klastry genów: *csgEFG* i *csgAB*, które kodują białka odpowiedzialne za tworzenie tego typu włókien [50]. Jak wykazały badania de Oliveira Pinheiro i wsp. [10] nad kolonizacją roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*, w przytwierdzeniu bakterii do powierzchni korzenia może także uczestniczyć śluz wydzielany przez korzenie. Adhezja komórek do powierzchni korzenia możliwa jest również dzięki produkcji biofilmu, którego struktura stabilizowana jest przez egzopolisacharydy (EPS). Wprowadzenie mutacji w obrębie genu *gumD*, zaangażowanego w syntezę EPS u szczepu *G. diazotrophicus* Pal5, uniemożliwia przytwierdzenie się mutantu do powierzchni korzenia i efektywną kolonizację gospodarza [28].

W kolonizacji rośliny przez bakterie, równie ważna jest zdolność bakterii endofitycznych do produkcji kwasu indoliloctowego (IAA). IAA produkowany przez bakterie endofityczne może stymulować tworze-

nie korzeni bocznych i włośników, co powoduje zwiększenie powierzchni korzeni, a tym samym możliwości wnikania bakterii do wnętrza rośliny. Bakteryjny IAA rozluźnia strukturę ściany komórkowej, jak też zwiększa ilość produkowanych polisacharydów, które mogą być wykorzystywane przez inne mikroorganizmy. Polisacharydy przyciągają kolejne potencjalne endofity bakteryjne oraz umożliwiają wzrost i rozwój bakteriom ryzodermalnym. Bakteryjne IAA umożliwiają również, ominięcie systemu obronnego gospodarza poprzez osłabienie sygnalizacji związanej z IAA, co z kolei może przyczyniać się do osiągnięcia sukcesu kolonizacyjnego [12].

Bakterie endofityczne mogą wnikać do wnętrza rośliny w miejscach naruszenia ciągłości tkanek. Jednakże, ze względu na syntezę zewnątrzkomórkowych enzymów odpowiedzialnych za degradację roślinnej ściany komórkowej (CWDE – Cell Wall Degrading Enzymes), część tych mikroorganizmów wnikając do komórek gospodarza nie wymaga obecności uszkodzeń [34, 45]. Zdolność syntezy enzymów pektynolitycznych, celulolitycznych i proteolitycznych stwierdzono u szczepów: *Azoarcus* sp. BH72 [20], *Azospirillum irakense*, *Bulkholderia* sp. PsJN, *Enterobacter asburiae* JM22, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp. IMBG294 [30], *Pseudomonas* sp. A3R3 [22], *Pseudomonas fluorescens* [34], *Klebsiella pneumoniae* 342 [13], *Azospirillum* sp. B510 [18] i *Pseudomonas stutzeri* A1501 [52].

W genomie endofitycznego szczepu *Azoarcus* sp. BH72 zidentyfikowano gen *eglA*, kodujący endoglukanazę (EC 3.2.1.4) hydrolizującą wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe celulozy. Zwiększoną ekspresję genu *eglA* obserwowano w komórkach bakterii bytujących w pobliżu korzeni bocznych i wierzchołków korzeni ryżu, które są głównymi miejscami wnikania bakterii do wnętrza rośliny. Jak wykazały badania Krause i wsp. [20], mutanty w genie *eglA* charakteryzowały się obniżoną zdolnością do wewnątrzkomórkowej kolonizacji epidermy korzeni i brakiem zdolności do systemicznego rozprzestrzeniania się w siewkach ryżu. W komórkach badanego szczepu nie wykazano obecności genów kodujących inne enzymy z grupy CWDE [20, 37].

Zdolność do produkcji enzymów degradujących ściany komórkowe roślin wykazano także u szczepów *G. diazotrophicus* Pal5 i UAP5541. Szczepy te syntetyzują endoglukanazę (EC 3.2.1.4), endopolimetylogalakturonazę (EC 3.2.1.15) i endoksyloglukanazę (EC 3.2.1.151), które w przeciwieństwie do endoglukanazy szczepu *Azoarcus* sp. BH72, umożliwiają wykorzystanie odpowiednio celulozy, pektyny i ksyloglukanu, jako jedyne źródła węgla. Jak sugerują badania Adriano-Anaya i wsp. [1], regulacja syntezy tych enzymów stanowi mechanizm kontroli wzrostu *G. diazotrophicus* Pal5 i UAP5541 wewnątrz korzeni gospodarza.

Tabela II  
Geny endofitów bakteryjnych warunkujące skuteczną kolonizację rośliny i funkcjonowanie bakterii w komórkach gospodarza

Szczep	Gen	Funkcja kodowanego peptydu/białka	Efekt inaktywacji genu	Źródło
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>pilT</i>	retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki białko	brak zdolności szczepu do ruchu drgającego, obniżenie o 50% zdolności szczepu do kolonizacji ryżu	[7]
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>pilA</i>	strukturalne pilusa typu IV	obniżona zdolność do formowania mikrokolonii na powierzchni korzenia ryżu	[7]
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>eglA</i>	hydroliza wiązań $\beta$ -1-4-glikozydowych celulozy	obniżona zdolność kolonizacji komórek epidermy korzeni ryżu	[20]
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	<i>mot1</i> , <i>mot2</i> , <i>mot3</i>	synteza wici, zdolność do ruchu chemotaktycznego	brak zdolności adsorpcji do powierzchni korzeni, obniżona zdolność kolonizacji pszenicy	[43]
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>chsA</i>	kinaza histydynowa, białko chemotaktyczne, zaangażowanych w przenoszenie sygnału	obniżona zdolność do chemotaksji i kolonizacji truskawek	[32]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>gumD</i>	produkcja egzopolisacharydów	obniżona zdolność adsorpcji do powierzchni korzeni, tworzenia biofilmu i kolonizacji ryżu	[28]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>sod</i>	dysmutaza nadtlenkowa, inaktywacja anionorodnika ponadtlenkowego	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[3]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>gr</i>	reduktaza glutationowa, odtwarzanie zredukowanej formy glutationu	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[3]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>flgA</i>	zdolność do ruchu chemotaktycznego	obniżona zdolność do tworzenia biofilmu i poruszania się	[39]
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	<i>hrpE</i> <i>hrcN</i>	białka systemu sekrecji typu III	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[41]
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>invA</i>	jedno z białek rdzenia kompleksu sytemu sekrecji typu III	indukcja odpowiedzi systemu odpornościowego tytoniu	[42]

Ekspansyny to białka obecne w ścianie komórkowej roślin odpowiedzialne za rozluźnianie jej struktury. Rozrywają one, na drodze nieenzymatycznej, niekowalencyjne wiązania między mikrofibrylami celulozowymi a glikanami [38]. Wiele mikroorganizmów oddziałujących z roślinami jest zdolna do produkcji białek podobnych do ekspansyn. Geny kodujące zewnątrzkomórkowe białka posiadające domeny o strukturze podobnej do ekspansyn znaleziono w genomie *Micromonospora lupini* Lupac 08 wyizolowanej z brodawek korzeniowych *Lupinus angustifolius*. Sugeruje się, że produkcja białek podobnych do ekspansyn przez bakterie endofityczne może być również istotna dla promocji ich interakcji z roślinnym gospodarzem [46]. Geny endofitów bakteryjnych warunkujące skuteczną kolonizację rośliny i funkcjonowanie bakterii w komórkach gospodarza zebrano w tabeli II.

### 3. Genetyczne podłoże odporności bakterii endofitycznych na stres oksydacyjny i osmotyczny

Rośliny wytworzyły szereg różnych mechanizmów warunkujących ochronę przed infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi i przed grzybami. Jednym z nich

jest produkcja reaktywnych form tlenu czy tlenu azotu [45]. W związku z tym, dla efektywnej kolonizacji komórek gospodarza, endofity bakteryjne muszą być przystosowane do przetrwania w środowisku bogatym w te związki [2].

*Enterobacter* sp. 638 to endofityczny szczep wyizolowany z topoli zdolny do promocji wzrostu roślin. W genomie tego szczepu zidentyfikowano szereg genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy usuwania reaktywnych form tlenu, między innymi geny dysmutazy ponadtlenkowej, peroksyreduktazy, chloroperoksydazy, peroksydazy tiolowej, jak również geny kodujące enzymy umożliwiające syntezę glutationu. Szczep ten zdolny jest również do detoksykacji wolnych rodników tlenu azotu dzięki obecności genu kodującego dioksygenazę tlenu azotu oraz grupy genów kodujących enzymy beztlenowej redukcji azotanów. W komórkach *Enterobacter* sp. 638 kluczowym regulatorem aktywującym ekspresję genów zaangażowanych w obronę przed stresem oksydacyjnym indukowanym nadtlenkiem wodoru jest białko OxyR [24].

W komórkach *K. pneumoniae* 342, diazotroficznego endofita o szerokim zakresie gospodarza, zidentyfikowano gen kodujący białko Ada niezbędne do aktywowania transkrypcji genów zaangażowanych



w odpowiedź komórki na uszkodzenia wzoru metylacji DNA, które mogą być spowodowane przez czynniki alkilujące lub tlenek azotu. Badany szczep posiada także gen *uvrA*, kodujący endonukleazę zaangażowaną w naprawę uszkodzeń DNA, wywołanych m.in. nadtlaniem wodoru oraz geny kodujące dysmutazę nadtlenkową, katalazę, peroksydazę, peroksyreduktazę i transferazę glutationową. Podobnie jak *Enterobacter* sp. 638, szczep *K. pneumoniae* 342 zdolny jest do usuwania wolnych rodników tlenu azotu dzięki obecności białka odpowiedzialnego za detoksykację tlenu azotu i grupy genów kodujących enzymy beztlenowej redukcji azotanów [13]. W genomach obu szczepów bakterii zidentyfikowano także geny kodujące kompleks białkowy – AcrAB. Pompa AcrAB odpowiedzialna jest za usuwanie z komórek bakteryjnych fitoaleksyn, które są produkowane przez rośliny w odpowiedzi na infekcje wywołane przez patogeny roślin [13, 45].

Obecność genów kodujących białka zaangażowane w usuwanie reaktywnych form tlenu wykazano także w genomie *P. putida* W619, endosymbionta wyizolowanego z topoli [50] oraz szczepu *P. stutzeri* A1501, kolonizującego i infekującego korzenie ryżu [52]. W komórkach *P. putida* W619 odpowiedź na stres oksydacyjny regulowana jest przez czynnik transkrypcyjny PerR, którego aktywność zależy od obecności jonów  $Fe^{2+}$  lub  $Mn^{2+}$ . Białko to wiąże się z DNA powodując represję genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny. W obecności nadtlenu wodoru białko PerR oddysocjuje od DNA, dzięki czemu regulowane przez ten represor geny mogą ulec ekspresji [24, 50]. W odpowiedzi na obecność reaktywnych form tlenu w komórkach szczepu *P. stutzeri* A1501 obserwuje się natomiast indukcję genu *bcp* kodującego białko Bcp o aktywności peroksydazy tiolowej zależnej od tioredoksyny [35].

W komórkach *Agrobacterium tumefaciens* [8] i *P. putida* [40] w ochronę przed stresem oksydacyjnym zaangażowane jest białko wiążące DNA – Dps (DNA-binding protein from starved cells), zidentyfikowane i opisane po raz pierwszy u *E. coli*. W przeciwieństwie do *E. coli*, w komórkach *A. tumefaciens* białko Dps nie wiąże się z DNA, lecz jego ochronna rola wynika ze zdolności wiązania jonów żelaza i hamowania formacji rodników hydroksylowych [8].

Znaczącą rolę enzymów zaangażowanych w procesy usuwania reaktywnych form tlenu: reduktazy glutationowej i dysmutazy nadtlenkowej w endofitycznej kolonizacji ryżu przez szczep *G. diazotrophicus* Pal5 wykazały badania Alqueres i wsp. [3]. Insercyjna inaktywacja genów *gr* i *sod* kodujących odpowiednio te dwa enzymy (tabela II), prowadziła do znacznego obniżenia liczby bakterii kolonizujących korzenie badanej rośliny.

W trakcie kolonizacji rośliny, komórki bakteryjne muszą poradzić sobie także ze wzrastającym ciśnieniem osmotycznym. Dlatego też, wiele endofitów bak-

teryjnych posiada geny kodujące białka umożliwiające szybką odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego. Na przykład, w genomie *Azoarcus* sp. CIB, zidentyfikowano geny kodujące białka zaangażowane w transport i metabolizm osmoprotektantów, takich jak: N-tlenek trimetyloaminy, poliaminy czy sarkozyna, oraz kilka kopii genów kodujących enzymy umożliwiające syntezę i degradację polihydroksymaślanu (PHB) [26].

*Herbaspirillum seropedicae* SmR1 i *H. frisingense* GSF30T są zdolne do produkcji innego ważnego osmoprotektanta – trehalozy. Szczep SmR1 posiada geny umożliwiające syntezę i degradację homopolimeru D-glukozy, którego metabolizm, podobnie jak w przypadku PHB produkowanego przez *Azoarcus* sp. CIB, może być związany ze zdolnością do radzenia sobie ze stresem osmotycznym i głodem [33, 44]. Szczep *G. diazotrophicus* Pal5 wykazuje tolerancję na wysokie stężenie sacharozy (do 30%), co stanowi ważne przystosowanie tej bakterii do bytowania w tkankach trzciny cukrowej, gdzie obserwuje się wysokie stężenie tego disacharydu. Tolerancja wysokich stężeń cukru może wynikać z obecności w komórkach szczepu Pal5 systemów transportu umożliwiających pobór proliny/betainy, di- i tripeptydów, jak też przewidywanej zdolności do syntezy, degradacji i transportu trehalozy. Pomimo wysokiej tolerancji na stres osmotyczny, szczep *G. diazotrophicus* Pal5 jest wrażliwy na stres solny. Zakłada się, że obecność jonów chlorkowych wpływa negatywnie na jego interakcje z roślinnym gospodarzem [5, 9].

#### 4. Mechanizmy sekrecji i translokacji białek efektorowych

W oddziaływaniu bakterie endofityczne-roślina istotną rolę odgrywają cząsteczki efektorowe wydzielane do środowiska zewnętrznego lub wprowadzane bezpośrednio do komórek gospodarza. Sekrecja i translokacja białek efektorowych to kluczowe strategie mikroorganizmów mające na celu osłabienie układu odpornościowego gospodarza.

W komórkach bakterii Gram-ujemnych opisano funkcjonowanie sześciu typów systemów translokacji i sekrecji białek (T1SS – T6SS). U większości opisanych dotąd endofitów najczęściej spotykane są systemy typu I (T1SS) i typu II (T2SS). T1SS odpowiada za transport białek bezpośrednio na powierzchnię komórki bakteryjnej lub do otaczającego ją środowiska, podczas gdy sekrecja z udziałem T2SS jest procesem dwuetapowym, obejmującym transport białek przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni peryplazmatycznej, a następnie na powierzchnię komórki [36].

Geny kodujące białka wchodzące w skład systemu sekrecji typu III zidentyfikowano w genomie endofi-

tycznego szczepu *H. seropedicae* SmR1 [33]. Sugeruje się, że obecność T3SS w komórkach tego szczepu może być związana z rozpoznawaniem bakterii przez gospodarza. Badania prowadzone z użyciem szczepu *Rhizobium* NGR234, wydzielającego białka efektorowe w odpowiedzi na flawonoidy wydzielane przez korzenie roślin, świadczą z kolei o roli systemu T3SS w optymalizacji oddziaływań bakteria–gospodarz. Jednym z białek efektorowych wydzielanych przez ten system jest białko NopL. Białko to hamuje ekspresję białek odpornościowych u gospodarza roślinnego. Ponadto, wykazano, że NopL wydzielane przez bakterie promuje tworzenie brodawek korzeniowych [2, 4, 33, 36]. Badania Shirron i Yaron [42] wykazały, że kolonizacja tytoniu (*Nicotiana tabacum*) przez żywe komórki *Salmonella* Typhimurium nie wywołuje objawów chorobowych, podczas gdy kolonizacja rośliny przez komórki niezdolne do syntezy białka NopL prowadzi do odpowiedzi ze strony układu odpornościowego rośliny. Indukcję systemu odpornościowego gospodarza wyrażającą się zmianami pH i produkcją reaktywnych form tlenu obserwowano także podczas kolonizacji tytoniu przez zmutowany szczep *Salmonella* Typhimurium, niosący delecję w genie *invA*, kodującym jedno z białek rdzenia kompleksu systemu sekrecji typu III (tabela II).

System sekrecji typu IV uczestniczy w procesie koniugacji oraz w transferze białek, DNA i nukleoproteinowych kompleksów do komórki docelowej. Obecność genów kodujących składniki kompleksu T4SS zlokalizowane zostały w genomie szczepów *G. diazotrophicus* PAL5, *K. pneumoniae* 342 i *Methylobacterium populi* BJ001. Dzięki systemowi T4SS szczep *A. tumefaciens* zdolny jest do wprowadzenia T-DNA do wnętrza komórki roślinnej [5, 36]. Identyfikacja systemów T3SS i T4SS u nielicznych bakterii endofitycznych może sugerować, że mechanizm modulacji odpowiedzi rośliny na wniknięcie bakterii, poprzez białka efektorowe wydzielane bezpośrednio do komórek gospodarza, nie jest powszechny w interakcjach endofit-roślina [36].

Dla większości zbadanych dotąd endofitów charakterystyczny jest system sekrecji typu V (T5SS). Jest on związany jest z transporterem Sec, który przenosi wydzielane białko do przestrzeni peryprazmatycznej, z której dzięki obecności w wydzielanym białku domeny translokacyjnej, przedostaje się ono na powierzchnię komórki [2]. Sekrecji z udziałem systemu T5SS ulegają na przykład białka zaangażowane w proces adhezji u szczepu *P. putida* W619 [50] czy też białka warunkujące kolonizację komórek roślinnych przez szczep *Enterobacter* sp. 638 [45].

Funkcjonowanie systemu sekrecji typu VI (T6SS) jest istotne dla przebiegu wielu procesów, między innymi: tworzenia biofilmu, koniugacji, regulacji QS, promocji i supresji wirulencji [15]. T6SS jest to kom-

pleks białkowy występujący u większości *Proteobacteria* umożliwiający translokację białek efektorowych do komórek eukariotycznych i prokariotycznych [21]. U wielu gatunków bakterii patogennych T6SS wydaje się być głównym czynnikiem determinującym ich wirulencję [27]. U *P. aeruginosa* natomiast, T6SS promuje antybakteryjną aktywność szczepu przeciw szerokiemu spektrum konkurencyjnych bakterii [15].

W komórkach szczepu *A. tumefaciens*, system T6SS zaangażowany jest w sekrecję rodziny białek efektorowych typu VI – DNaz (Tde), które wykazują aktywność antybakteryjną. Ochronę komórek bakteryjnym przed Tde zapewnia białko Tdi. Zdolność do sekrecji białka Tde jest jednym z przystosowań szczepu *A. tumefaciens* do kolonizacji rośliny. Obecność genów *tde/tdi* w genomach bakterii kolonizujących rośliny sugeruje konserwatywność tego mechanizmu u fitobakterii, jako sposobu uzyskania przewagi w środowiskach zasiedlanych przed wiele gatunków bakterii. Wykazano, że funkcjonowanie systemu T6SS może mieć także pozytywny wpływ na interakcje endofit-roślina [21]. Geny kodujące ten system sekrecji znalezione zostały w genomie niektórych bakterii endofitycznych, na przykład w komórkach *P. fluorescens* PICF7, u którego zlokalizowano dwa zestawy genów kodujących elementy tego systemu sekrecji [26].

Brak u niektórych bakterii endofitycznych genów kodujących kompleksy systemu sekrecji typu III i IV i obecność genów systemu sekrecji typu VI wskazuje, że organizmy będące endofitami można scharakteryzować jako „rozbrojone patogeny” [2].

## 5. Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w interakcje endofit bakteryjny–gospodarz

W wyniku analizy porównawczej genomów endofitów bakteryjnych zidentyfikowano grupę konserwatywnych czynników regulujących metabolizm komórkowy, które najprawdopodobniej odpowiedzialne są za zachowania endofityczne. Do czynników tych należą białka: AraC, FrmR, AsnC, LrgB, LysR, DeoR i WrbA [2].

AraC to rodzina bakteryjnych czynników regulatorowych oddziałujących z DNA, które aktywują proces transkrypcji wielu różnych genów, chociaż mogą również działać jako represory tego procesu. Białka rodziny AraC zaangażowane są w regulację metabolizmu cukrów, procesów patogenezы i odpowiedzi na warunki stresowe [16].

Kolejna rodzina białek regulatorowych, LrgB, zaangażowana jest przede wszystkim w kontrolę aktywności mureinaz. Dlatego też, białka te najprawdopodobniej zaangażowane są w regulację nieinwazyjnej degradacji roślinnych ścian komórkowych, która zachodzi podczas infekcji gospodarza przez bakterie endofityczne [2].

Regulatory transkrypcji zaliczone do rodziny LysR należą do najbardziej rozpowszechnionych w królestwie *Prokaryota*. Uczestniczą one w regulacji ekspresji wielu funkcjonalnie zróżnicowanych zestawów genów. Do genów regulowanych przez białka LysR należą geny zaangażowane w wirulencję, metabolizm komórkowy, *quorum sensing*, zdolność do poruszania się, odpowiedź na stres oksydacyjny (np. OxyR i PerR), jak również w produkcję toksyn i ich sekrecję [23, 24].

Do wymienionych czynników transkrypcyjnych, które mogą być zaangażowane w interakcje gospodarz–endofit bakteryjny zaliczono również białko WrbA, flawoproteinę, której synteza w komórkach *E. coli* indukowana jest przez produkt genu *rpoS* kodującego alternatywny czynnik transkrypcyjny  $\sigma S$  regulujący ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź komórki na czynniki stresowe. Jednakże rola białek WrbA w oddziaływaniu bakterii z roślinami nie została jeszcze w pełni wyjaśniona [2].

## 6. Zmiany w ekspresji genów w interakcji endofit bakteryjny–roślina

Ze względu na to, że kolonizacja roślin przez bakterie wpływa na wzrost i rozwój roślin, wytworzyły one szereg molekularnych mechanizmów warunkujących odpowiedź na inwazję przez te mikroorganizmy. Wiele genów roślinnych ulega zmienionej ekspresji podczas interakcji bakteria-roślina [48, 49]. Sugeruje to, że początkowe etapy kolonizacji rośliny przez bakterie endofityczne są aktywnie monitorowane i prawdopodobnie wzmocnione lub osłabiane przez gospodarza. Przykładem genu, którego ekspresja ulega zmianie podczas kolonizacji rośliny jest gen *shr5* kodujący białko zaangażowane w transdukcję sygnałów w komórkach roślinnych. Po inokulacji trzciny cukrowej diazotroficznymi bakteriami *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* i *A. brasilense* obserwuje się obniżenie ekspresji tego genu [34]. Wyniki badań Vinagre i wsp. [47] wskazują, że im bardziej korzystna dla rośliny jest kolonizacja przez endofity, tym niższy poziom ekspresji genu *shr5*.

Nadekspresję genów związanych z chemotaksją oraz sekrecją obserwowano u szczepu *P. aeruginosa* w odpowiedzi na substancje wydzielane przez korzenie buraka cukrowego. W komórkach Gram-dodatniego szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 obserwowano silną indukcję ekspresji genów odpowiedzialnych za chemotaktyczny ruch komórki oraz rozkład substratów odżywczych, wywołaną przez wydzieliny korzeni kukurydzy. Analiza transkryptomu endofitycznego szczepu *B. subtilis* OKB105 przeprowadzona przez Xie i wsp. [51] wykazała natomiast zmiany w ekspresji 176 genów badanego szczepu po inkubacji z siewkami ryżu. Obserwowane zmiany w poziomie transkryp-

cji dotyczyły genów zaangażowanych w metabolizm, transport cukrów i aminokwasów, chemotaksję i ruch komórki, jak również sporulację i biosyntezę kwasu teichuronowego [51].

## 7. Podsumowanie

Bakterie endofityczne znajdują coraz więcej zastosowań w różnych dziedzinach biotechnologii, szczególnie w biotechnologii roślin i biotechnologii środowiska. Badania polowe potwierdzają skuteczność inokulowania roślin endofitami bakteryjnymi w celu stymulowania wzrostu gospodarza, jego ochrony przed szkodnikami, wskazują także na pozytywne aspekty wykorzystania tych organizmów do wspomagania procesów fitoekstrakcji oraz fitoremediacji terenów zdegradowanych. Bakterie te są również źródłem wielu substancji czynnych o właściwościach antibakteryjnych, przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych czy przeciwgrybiczych. Dlatego też, niezmiernie istotnym wydaje się identyfikacja genów odpowiedzialnych za „endofityczne” zachowania oraz zrozumienie i poszerzenie wiedzy o genetycznych aspektach oddziaływań endofity bakteryjne – rośliny. Umożliwi to pełne wykorzystanie potencjału tej grupy bakterii.

## Piśmiennictwo

- Adriano-Anaya M., Salvador-Figueroa M., Ocampo J.A., García-Romera I.: Plant cell-wall degrading hydrolytic enzymes of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*, **40**, 151–156 (2005)
- Ali S., Duan J., Charles T.C., Glick B.R.: A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* **343**, 193–208 (2014)
- Alqueres S., Meneses C., Rouws L., Rothballer M., Baldani I., Schmid M., Hartmann A.: The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 937–945 (2013)
- Bartsev A.V., Deakin W.J., Boukli N.M., McAlvin C.B., Stacey G., Malnoe P., Broughton W.J., Staehelin C.: NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* **134**, 871–879 (2004)
- Bertalan M., Ferreira P.C.G. i wsp.: Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, **10**, 450–457 (2009)
- Boyer M., Bally R., Perrotto S., Chaintreuil C., Wisniewski-Dyé F.: A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res. Microbiol.* **159**, 699–708 (2008)
- Böhm M., Hurek T., Reinhold-Hurek B.: Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing *Azoarcus* sp. strain BH7. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 526–533 (2007)
- Ceci P., Ilari A., Falvo E., Chiancone E.: The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: x-ray crystal structure, iron binding,



- and hydroxyl-radical scavenging properties. *J. Biol. Chem.* **278**, 20319–20326 (2003)
9. de Oliveira M.V., Intorne A.C., Vespoli L.S., Madureira H.C., Leandro M.R., Pereira T.N., Olivares F.L., Berbert-Molina M.A., De Souza Filho G.A.: Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch. Microbiol.* **198**, 287–294 (2016)
  10. de Oliveira Pinheiro R., Boddey L., James E., Sprent J., Bodde R.: Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil*, **246**, 151–166 (2002)
  11. Dourado M.N., Bogas A.C., Pomini A.M., Andreote F.D., Quecine M.C., Marsaioli A.J., Araújo W.L.: *Methylobacterium*-plant interaction genes regulated by plant exudate and quorum sensing molecules. *Braz. J. Microbiol.* **10**, 1331–1339 (2014)
  12. Etesami H., Alikhani H.A., Hosseini H.M.: Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, **2**, 72–78 (2015)
  13. Fouts D.E., Methé B.A. i wsp.: Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* **4**(7), e1000141 doi: 10.1371/journal.pgen.1000141 (2008)
  14. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
  15. Hood R.D., Mougous J.D. i wsp.: A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*, **7**, 25–37 (2010)
  16. Ibarra J.A., Pérez-Rueda E., Segovia L., Puente J.L.: The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica*, **133**, 65–76 (2008)
  17. Jiang J., Wu S., Wang J., Feng Y.: AHL-type quorum sensing and its regulation on symplasmata formation in *Pantoea agglomerans* YS19. *J. Basic. Microbiol.* **55**, 607–616 (2015)
  18. Kaneko T., Sato S. i wsp.: Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res.* **17**, 37–50 (2010)
  19. Klama J.: Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scient. Polon.* **31**, 19–28 (2004)
  20. Krause A., Goesmann A. i wsp.: Complete genome of the mutualistic, N<sub>2</sub>-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1385–1391 (2006)
  21. Ma L.S., Hachani A., Lin J.S., Filloux A., Lai E.M.: *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, **16**, 94–104 (2014)
  22. Ma Y., Rajkumar M., Luo Y.M., Freitas H.: Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—Effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.* **195**, 230–237 (2011)
  23. Maddocks S.E., Oyston P.C.: Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, **154**, 3609–3623 (2008)
  24. Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F.: Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* **2**, 535–562 (2014)
  25. Martín-Moldes Z., Díaz E. i wsp.: Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 462–471 (2015)
  26. Martínez-García P.M., Ruano-Rosa D., Schilirò E., Prieto P., Ramos C., Rodríguez-Palenzuela P., Mercado-Blanco J.: Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahlia*. *Stand. Genomic Sci.* **10**, 10 (2015)
  27. Mattinen L., Somervuo P., Nykyri J., Nissinen R., Kouvonen P., Corthals G., Auvinen P., Aittamaa M., Valkonen J.P., Pirhonen M.: Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, **154**, 2387–2396 (2008)
  28. Meneses C.H.S.G., Rouws L.F.M., Simoes-Araujo J.L., Vidal M.S., Baldani J.I.: Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1448–145 (2011)
  29. Mitter B., Petric A., Shin M.W., Chain P.S., Hauberg-Lotte L., Reinhold-Hurek B., Nowak J., Sessitsch A.: Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant. Sci.* **4**, 120 (2013)
  30. Pavlo A., Leonid O., Iryna Z., Natalia K., Maria P.A.: Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biol. Control*, **56**, 43–49 (2011)
  31. Pedraza R.O., Mentel M.I., Ragout A.L., Xiqui M.L., Segundo M.D., Baca B.E.: Plant growth-promoting bacteria: The role of chemotaxis in the association *Azospirillum brasilense*-plant. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge. (2009)
  32. Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Diaz-Ricci J.C.: Plant growth-promoting bacteria: The role of chemotaxis in the growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 265–272 (2009)
  33. Pedrosa F.P., Souza E.M. i wsp.: Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet.* **7**, e1002064. doi: 10.1371/journal.pgen.1002064 (2011)
  34. Pisarska K., Pietr S.J.: Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Post. Mikrobiol.* **53**, 141–151 (2014)
  35. Rediers H., Bonnacerrere V., Rainey P.B., Hamonts K., Vanderleyden J., De Mot R.: Development and application of a dapB-based *in vivo* expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6864–6874 (2003)
  36. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 435–443 (2011)
  37. Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M., Hurek T.: An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 181–188 (2006)
  38. Rodakowska E., Kasproicz A., Łapa A., Łuczak M., Derba M., Wojtaszek P.: Ściany komórkowe jako źródło sygnałów regulujących procesy rozwojowe komórek roślin. *Biotechnologia*, **4**, 18–35 (2006)
  39. Rouws L.F.M., Simoes-Araujo J.L., Hemerly A.S., Baldani J.I.: Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch. Microbiol.* **189**, 397–405 (2008)
  40. Saumaa S., Tover A., Tark M., Tegova R., Kivisaar M.: Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **189**, 5504–5514 (2007)
  41. Schmidt M.A., Monteiro R.A. i wsp.: The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Poaceae*. *BMC Microbiol.* **12**, 98 (2012)
  42. Shirron N., Yaron S.: Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella*



- typhimurium*. *PLoS One*, **6**, e18855. doi: 10.1371/journal.pone.0018855 (2011)
43. Steenhoudt O., Vanderleyden J.: *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 487–506 (2000)
  44. Straub D., Rothballer M., Hartmann A., Ludewig U.: The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front. Microbiol.* **4**, 168 (2013)
  45. Taghavi S., van der Lelie D., Hoffman A., Zhang Y.B., Walla M.D., Vangronsveld J., Newman L., Monchy S.: Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet.* **6**(5), e1000943. doi: 10.1371/journal.pgen.1000943 (2010)
  46. Trujillo M.E., Bacigalupe R., Pujic P., Igarashi Y., Benito P., Riesco R., Médigue C., Normand P.: Genome features of the endophytic actinobacterium *Micromonospora lupini* strain Lupac 08: on the process of adaptation to an endophytic life style? *PLoS One*, **9**, e108522 (2014)
  47. Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C., Hemerly A.S.: SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacteria association. *J. Exp. Bot.* **57**, 559–569 (2006)
  48. Wang Y., Ohara Y., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S.: Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 385–396 (2005)
  49. Wang W., Chen L.N., Wu H., Zang H., Gao S., Yang Y., Xie S., Gao X.: Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **56**, 208–215 (2013)
  50. Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., van der Lelie D.: Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 299–323 (2010)
  51. Xie S., Wu H., Chen L., Zang H., Xie Y., Gao X.: Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiol.* **15**, 21 (2015)
  52. Yan Y., Jin Q. i wsp.: Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7564–7569 (2008)
  53. Zhang X., Li E., Xiong X., Shen D., Feng Y.: Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1667–1673 (2010)