

Katarzyna Pisarska^{1*}, Stanisław J. Pietr¹

¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wpłynęło w sierpniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Źródła bakterii endofitycznych. 3. Kolonizacja rośliny – gospodarza przez bakterie endofityczne. 4. Oddziaływania molekularne. 5. Znaczenie bakterii endofitycznych dla roślin. 6. Endofity jako potencjalne patogeny i inhibitory wzrostu roślin 7. Podsumowanie

Bacterial endophytes – the is origin and interaction with plants

Abstract: Endophytic bacteria colonize tissue of healthy plants. The source of these bacteria are plant seedlings, seeds and soil. The impact of these microorganisms on plants have been tested for biological control of pathogens, induction of systemic resistance, promote growth and development of plants through binding of free nitrogen, increase in minerals uptake and increase plant resistance to unfavorable abiotic factors. The most numerous reported taxa of endophytic bacteria belong to the genres of phyla *Proteobacteria* (*Azospirillum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*), *Bacteroidetes* (*Flavobacterium*) and *Firmicutes* (*Bacillus*).

Endophytes show a great potential in plant production. Increasing interest in these microorganisms in plants protection seems to be an essential part of sustainable crop production. Indeed, their use may bring benefits for agriculture, including increased efficiency of mineral fertilizer, reduce agricultural production costs through more efficient use of fertilizers as well as reduced application of synthetic pesticides. Adoption of microbes will also reduce negative impact of crop production on environment. To avoid potential human pathogens in plant protection, microbes have to undergo a comprehensive risk assessment. In the EU, this assessment is based on principles which were originally developed for pesticides. Although the EU directive concerning the registration of microorganisms as Biological Control Agents, has been adapted to better understand the requirements of microorganisms, it is still time consuming and require large financial input. In EU countries, registration of BCAs lasts up to 7 years, which discourages this type of research and keeps safer plant protection products off the market.

1. Introduction. 2. Sources of endophytic bacteria. 3. Plant colonization 4. Molecular interactions. 5. Effects of endophytic bacteria to the plant. 6. Bacterial endophytes like a potential pathogens and plant growth inhibitors 7. Conclusions

Słowa kluczowe: endofity, bakterie, występowanie, wzrost roślin

Key words: endophytic bacteria, occurrence, plant growth

1. Wstęp

W warunkach naturalnych wzrost roślin jest ściśle uzależniony od towarzyszących im drobnoustrojów. Unikalne zespoły mikroorganizmów towarzyszące roślinom, jak w każdym biotopie, kształtowane są przez specyficzne cechy fizyko-chemiczne gleb jak również aktywność metaboliczną danej rośliny. Aktywne fizjologicznie drobnoustroje w glebie zasiedlają głównie strefę w pobliżu korzeni roślin tworząc specyficzną niszę, rizosferę. Pojęcie rizosfera w 1904 roku po raz pierwszy użył Hiltn er, „ryzo” z łacińskiego i „sphaera” z greckiego. Rizosfera to gleba podlegający oddziaływaniom wydzielin systemu korzeniowego i zasiedlające go drobnoustroje, które wykorzystują wydzieliny korzeniowe jako źródło węgla, azotu i energii [33]. Rizosfera jest uprzywilejowanym miejscem wzajemnego oddziaływania drobnoustrojów glebowych i roślin [65]. Większości drobnoustrojów rizosferowych jest neutralna, ponieważ nie wywiera żadnego zauważalnego wpływu na wzrost i rozwój roślin. Wzajemne oddziaływania roślina – mikroorganizmy rizosferowe mogą być

antagonistyczne lub nieantagonistyczne. Istotną rolę w zwiększeniu efektywności produkcji roślinnej jak i możliwości zasiedlania i przetrwania roślin w środowiskach naturalnych odgrywają mikroorganizmy, które wchodzą w różnego rodzaju nieantagonistyczne interakcje z roślinami. Wśród nich najlepiej poznane są układy symbioz mutualistycznych przynoszących korzyści obu stronom lub komensalizm korzystny dla jednej, a dla drugiej strony takiego układu jest obojętny. Specyficznym rodzajem symbiozy pomiędzy drobnoustrojami a roślinami jest endosymbioza. Występuje ona w momencie, gdy komórki jednego organizmu żyją we wnętrzu komórek lub tkanek innego organizmu. Od kilkudziesięciu lat wiadomo również, że drobnoustroje zasiedlają zdrowe rośliny. Bakterie te nazwano endofitami. Samo słowo „endofit” (*endophyte*) oznacza dosłownie „wewnątrz rośliny”, „endon” z greckiego to „wewnątrz” a „phyton” to „roślina”. Prawdopodobnie każda roślina jest gospodarzem dla jednego lub kilku gatunków bakterii [90].

Za endofity uważa się drobnoustroje, zarówno bakterie jak i grzyby, które bytując we wnętrzu rośliny, nie

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, ul. Grunwaldzka 53, Wrocław 50-375; katarzyna.pisarska@up.wroc.pl

powodują choroby gospodarza [30, 36]. W praktyce termin ten określa te drobnoustroje, które można wyizolować z powierzchniowo zdezynfekowanych tkanek roślinnych, które nie wykazują objawów chorobowych [30]. H a r d o i m i wsp. [29] podzielili endofity na:

- endofity fakultatywne – drobnoustroje które mogą żyć we wnętrzu roślin oraz w innych środowiskach;
- endofity obligatoryjne – drobnoustroje żyjące tylko i wyłącznie we wnętrzu rośliny, nie posiadają żadnego stadium życiowego, które przebiegałoby w środowisku zewnętrznym, przenoszone przez wektory;
- endofity okazjonalne – drobnoustroje, które okazjonalnie kolonizują wnętrza rośliny jednocześnie czerpiąc z tego korzyści, w postaci dostępu do składników odżywczych, ochrony przed czynnikami zewnętrznymi lub braku konkurencji.

Wiele bakterii endofitycznych, które do tej pory zostały poznane wyizolowano z rizosfery, rizoplany lub z wnętrza tkanek roślinnych [39]. Wpływ tych bakterii na rośliny przebadano już pod kątem biologicznego zwalczania drobnoustrojów chorobotwórczych, indukcji odporności systemicznej, promowania wzrostu i rozwoju rośliny poprzez wiązanie wolnego azotu, syntezę fitostymulatorów, zwiększenia pobierania składników mineralnych czy zwiększenia odporności rośliny na niekorzystne czynniki abiotyczne. Najczęściej opisywanymi taksonami bakterii endofitycznych zasiedlających tkanki roślinne są z typu *Proteobacteria* rodzaje *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pantoea* i *Pseudomonas*, z typu *Bacteroidetes* rodzaj *Flavobacterium* oraz z typu *Firmicutes* rodzaj *Bacillus* [55]. Jednak niewielka grupa roślin została kompleksowo przeanalizowana pod względem zasiedlających je endofitów [79]. Najczęściej zespoły bakterii endofitycznych zasiedlających tkanki roślinne nie są ograniczone tylko do jednego gatunku drobnoustroju, ale stanowią wachlarz rodzajów i gatunków [77].

2. Źródła bakterii endofitycznych

Jednym z podstawowych pytań dotyczących endofitów bakteryjnych, jest ich pochodzenie. W przypadku roślin rozmnażanych wegetatywnie, między innymi przez bulwy, cebule, kłaczka, rozłogi czy sadzonki, części te, a co za tym idzie, rośliny potomne są już skolonizowane przez endofity [14].

Hipoteza zaproponowana przez M u n d t i H i n k l e [59], zakłada, że źródłem endofitów dla rośliny są nasiona. Ich badania nad obecnością bakterii endofitycznych w załączkach roślinnych i nasionach 27 gatunków wykazały, że są one źródłem endofitów, w szczególności w przypadku nasion o uszkodzonych okrywkach nasiennych. Badania C a n k a r' a i wsp. [9] nad obecnością endofitów w nasionach świerku pospo-

litego wykazały obecność bakterii przede wszystkim w okrywie nasiennej, ale również w bielmie i zarodku. Również w przypadku niektórych gatunków eukalip-tusów nasiona stanowią rezerwuuar bakterii endofitycznych [17]. K a g a i wsp. [37] wykazali, iż ziarna ryżu są ważnym źródłem bakterii zasiedlających tkanki tej rośliny. Te drobnoustroje, które zasiedlają okrywkę nasienną ryżu wykazują zdolność do infekowania kolejnego pokolenia i są dominującymi gatunkami w tkankach w pełni rozwiniętej rośliny. Najprawdopodobniej o ilości i/lub obecności endofitów w nasionach decyduje okrywa nasenna. Im jest ona bardziej nierówna, tym większa jest liczba endofitów je zasiedlająca. W przypadku nasion o okrywie grubej i gładkiej dostęp drobnoustrojów do wnętrza jest znacznie utrudniony. Nasiona, w których do tej pory nie wykryto drobnoustrojów endofitycznych, mogą być zasiedlane przez nieliczne bakterie w swoich najgłębszych warstwach [26] i należałoby oczekiwać, że siewki takich roślin powinny być zasiedlane przez endofity. W badania własnych nad endofitami kukurydzy nie stwierdziliśmy żadnych „hodowalnych” bakterii w 14–20-dniowych siewkach roślin, rosnących w jałowych warunkach, pozyskanych z powierzchniowo-dezynfekowanych nasion 6 odmian [66].

Wielu badaczy podkreśla, że istotnym źródłem bakterii endofitycznych są drobnoustroje zasiedlające rizosferę. Gleba stanowi ważny rezerwuuar drobnoustrojów. Bakterie z rizosfery wnikają do wnętrza korzenia poprzez tak zwane *hot spots* czyli miejsca powstawania korzeni bocznych, uszkodzone tkanki i mikropory a następnie migrują we wnętrzu rośliny poprzez apoplast i/lub tkanki przewodzące [32, 34]. Dzięki temu mogą zasiedlać przestrzenie międzykomórkowe, ksyłem a rzadziej wnętrza komórek szeregu organów, takich jak: korzenie, łodygi, liście, nasiona czy owoce. Część endofitów dostaje się również do wnętrza rośliny z fyllosfery poprzez aparaty szparkowe, przetchlinki lub uszkodzenia naziemnych części. Wykrywanie endofitów w tkance roślinnej uzależnione jest w dużej mierze od procesów metabolicznych gospodarza, jego wieku, rodzaju zasiedlanej tkanki a także od sezonu wegetacyjnego, w którym dokonuje się izolacji [29].

3. Kolonizacja rośliny – gospodarza przez bakterie endofityczne

Część endofitów, która zasiedla nasiona, gwarantuje sobie tym samym obecność w nowej roślinie. Dotyczy to również endofitów przenoszonych wraz z sadzonkami, bulwami czy podkładkami drzew owocowych. Drobnoustroje te znajdują się w uprzywilejowanej sytuacji i mogą podlegać niewielkim modyfikacjom ze strony mikroorganizmów rizosferowych. W przypadku

endofitów pochodzących z rizosfery, muszą one skolonizować nowego gospodarza poprzez korzeń. Kolonizacja korzenia przebiega w dwóch fazach. W pierwszej z nich bakterie wiążą się na komórkach korzenia i wraz z jego wzrostem rozmieszczane są na całej powierzchni. W fazie drugiej drobnoustroje namnażają się w przestrzennie ograniczonych siedliskach [24].

W ryzosferze dochodzi do selekcji drobnoustrojów, które posiadają większą zdolność do wykorzystywania wydzielin korzeniowych jako źródła węgla i energii i mogą rywalizować z innymi bakteriami [77]. Pierwszy etap procesu kolonizacji rozpoczyna się od rozpoznania tych specyficznych wydzielin korzeniowych rośliny przez bakterie. W wyniku rozpoznania specyficznych związków organicznych w wydzielinach, np. określonych kwasów fenolowych lub aminokwasów, drobnoustroje migrują w kierunku ich źródła. Proces ten nazywamy chemotaksją. Zdolność chemotaksji w kierunku określonych komponentów wydzielin korzeniowych jest istotnym elementem kolonizacji roślin przez bakterie [24], również przez drobnoustroje endofityczne. Pokazują to badania *Bacilio-Jimenez* i wsp. [2]. Wśród wydzielin korzeniowych ryżu stwierdzili oni dominację glukozy, arabinozy, mannozy, galaktozy oraz aminokwasów takich jak histydyna, prolina, alanina oraz glicyna. Największe stężenie oraz zróżnicowanie węglowodanów i aminokwasów odnotowano w pierwszych dwóch tygodniach po wysiewie roślin. Chemotaksja endofitycznych izolatów *Corynebacterium flavesces* oraz *Bacillus pumilus* w stosunku do składników wydzielin korzeniowych ryżu była, odpowiednio 3,9–5,1 razy większa niż u testowego izolatu *Azospirillum brasiliense* oraz 2,2–2,8 razy większa w stosunku do *Bacillus* sp., drugiego testowego izolatu. Istotnym czynnikiem zapewniającym potencjalnym endofitom przewagę jest zdolność do wykorzystywania wielu składników wydzielin korzeniowych w procesie kolonizacji korzeni [62]. Szczepy *P. stutzeri* PPS96, PSR2 oraz PSR21, które najefektywniej kolonizowały korzenie pszenicy wykorzystywały jako jedyne źródło węgla i energii kwasy *p*-hydroksyfenylooctowy, bromobursztynowy, benzoesowy, pirogronian metylu, N-acetylo-D-glukozamone, D-trehalozę oraz rybitol w przeciwieństwie do szczepów z tego samego gatunku o słabych zdolnościach do zasiedlania korzeni [62]. *Hallman* [27] uważa, że do kontaktu gospodarza z potencjalnymi endofitami może dojść również na drodze elektrotaksji. Natomiast *Shaw* i wsp. [83] stwierdzili, iż istotnymi czynnikami odgrywającymi rolę w komunikacji roślina – bakteria są flawonoidy. Rola flawonoidów w stymulowaniu kolonizacji rośliny przez bakterie może mieć powiązanie z indukcją genów bakteryjnych odpowiedzialnych za syntezę lipopolisacharydu, który bierze udział w interakcji z receptorami błonowymi roślin [74].

Kolejnym etapem kolonizacji jest adhezja do powierzchni korzenia, a następnie intensywne podziały, które skutkują powstaniem mikrokolonii [11, 35]. Wstępny etap adhezji to słabe, odwracalne oddziaływanie międzycząsteczkowe np. typu oddziaływań van der Waalsa. Po nich następuje kolejna, nieodwracalna faza spowodowana wiązaniem się za pośrednictwem fimbrii lub flagelli. Do kontaktu pomiędzy bakterią a powierzchnią korzenia może również dochodzić przy udziale zewnątrzkomórkowych białek bądź polymerów otoczkowych biorących udział w formowaniu kolonii [24]. Potencjał adhezyjny drobnoustrojów uzależniony jest od fazy wzrostu i stopnia odżywienia komórek. Bakterie będące w fazie logarytmicznej przylegają w większym stopniu niż komórki znajdujące się w fazie stacjonarnej [24]. *Michiels* i wsp. [57] podzielili kolonizację korzenia pszenicy przez *A. brasiliense* Sp7 na dwa etapy. Pierwszy z nich to adsorpcja (Ads) na powierzchni korzenia, osiąga maksymalny poziom po 2 godzinach inkubacji. Uzależniona jest od bakteryjnych białek powierzchniowych. Oddziaływania te jednak są słabe, gdyż drobnoustroje adsorbowane na powierzchni korzenia mogą zostać mechanicznie usunięte poprzez ich wirowanie. Drugi etap kolonizacji to zakotwiczenie (Anc) komórek zaabsorbowanych na powierzchni oraz komórek wolnych. Etap ten rozpoczyna się dopiero po 8 godzinach inkubacji a swoje maksimum osiąga po 16 godzinach inkubacji. Oba etapy są od siebie niezależne, gdyż mutanty izolatów *A. brasiliense* Sp7 pozbawione zdolności do adsorpcji nadal wykazywały zdolność do zakotwiczenia na powierzchni. Etap zakotwiczenia uzależniony jest natomiast od syntezy bakteryjnych zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Potwierdza to fakt, iż mutanty pozbawione zdolności biosyntezy Cal (*Calcofluor-binding polysaccharide*) wykazywały 6-krotnie oraz 15-krotnie mniejszą zdolność zakotwiczenia niż szczep z którego pochodziły.

W strefie korzenia drobnoustroje wnikają poprzez miejsca powstawania korzeni bocznych oraz poprzez strefę wydłużania i różnicowania się komórek [76]. *Prieto* i wsp. [67] wskazali istotną rolę włośników w trakcie kolonizacji *Olea europaea* L. przez *P. fluorescent* PICF7. Rizolplana korzeni oliwki europejskiej została szybko skolonizowana przez szczep *P. fluorescent* PICF7 znakowany markerem *egfp* (*the enhanced green fluorescent protein*). Bakterie obserwowano na całej powierzchni włośników od drugiego dnia po bakteryzacji trzymiesięcznych roślin oliwki europejskiej. Kolonizację wnętrza włośników zaobserwowano już trzeciego dnia po bakteryzacji, występowała ona jednak sporadycznie, gdyż mniej niż 2% włośników zostało skolonizowanych wewnętrznie. Wewnątrz włośników bakterie występowały w postaci pojedynczych komórek lub tworzyły kolonie doczepione do wewnętrznych

struktur błonowych włóśników. Jednoczesna bakteryzacja roślin szczepem *P. fluorescent* PICF7 znakowany markerem *egfp* lub markerem *rfp* (*the red fluorescent protein*) wykazała zróżnicowaną kolonizację przez komórki wywodzące się z tych dwóch znakowanych szczepów. Oba znakowane izolaty zostały zaobserwowane na epidermie włóśników i dzieliły to samo miejsce kolonizacji, przy czym populacja pochodząca od jednej znakowanej komórki dominowała nad drugą. Sugeruje to wcześniejszą kolonizację określonego miejsca na włóśniku przez jedną komórkę. Jednocześnie zaobserwowano kolonizację wnętrza włóśników, które zawierały mieszaninę izolatów *P. fluorescent* PICF7 znakowanych *egfp* jak również *rfp*. Dowodzi to, iż wejście do wnętrza włóśnika jednej komórki bakteryjnej nie zapobiega adhezji i penetracji przez inne komórki.

Naruszenie ciągłości tkanek, wywołane przez patogeny lub czynniki mechaniczne, również stwarza „wrota” wejścia dla endofitów. Jednak „wrota” nie są wymagane, gdyż endofity bakteryjne potrafią wydzielać kompleksy enzymów CWDE (*Cell Wall Degrading Enzymes*) takich jak enzymy celulolityczne, pektynolityczne i proteolityczne. Pozakomórkowe wydzielanie CWDE w celu degradacji roślinnej ściany komórkowej została stwierdzona między innymi u *Azoarcus* sp. BH72 [73], *Azospirillum irakense* [38], *Burkholderia* sp. PsJN [10], *Enterobacter asburiae* JM22 [68], *Klebsiella oxytoca* [41] czy *Pseudomonas fluorescens* [6]. Według Hallmana i wsp. [26] synteza enzymów degradujących ściany komórkowe ma miejsce tylko i wyłącznie w momencie kolonizowania epidermy korzenia, nigdy w momencie kolonizowania przestrzeni międzykomórkowych rdzenia korzenia. Bakterie endofityczne produkują enzymy hydrolityczne we wczesnej fazie inwazji, a nie w trakcie bytowania we wnętrzu gospodarza [6]. Niska aktywność wydzielanych enzymów hydrolitycznych odróżnia bakterie endofityczne od patogenów bakteryjnych, których komórki wydzielają większą ilość enzymów hydrolitycznych powodujących uszkodzenia komórek roślinnych [16]. Quidt-Hallman i wsp. [69] udowodnili iż, bakterie endofityczne w aktywny sposób kolonizują gospodarza. Inokulacja nasion bawełny martwymi komórkami *E. asburiae* JM22 nie wykazała obecności bakterii nawet na powierzchni korzenia. W przypadku inokulacji nasion bawełny żywymi komórkami obecność drobnoustrojów została stwierdzona na powierzchni korzenia, pomiędzy komórkami epidermy, w przestrzeniach komórkowych blisko powierzchni korzenia oraz w pobliżu tkanek przewodzących. Pojedyncze komórki bakterii zaobserwowano nawet we wnętrzu komórek epidermy.

Mikrokolonie powstające na powierzchni korzenia stanowią punkt wypadkowy do inwazji do wnętrza tkanki roślinnej. W momencie, gdy komórki bakterii

endofitycznych są już we wnętrzu rośliny intensywnie dzielą się i kolonizują przestrzenie międzykomórkowe kory korzenia, a następnie kolonizują roślinę systemowo poprzez transport elementami przewodzącymi i/lub apoplastem [32, 34, 68]. Dystans, który pokonują drobnoustroje w trakcie rozprzestrzeniania w roślinie wynosi nawet 4 cm [27]. Peterson i wsp. [63] zaobserwowali, iż transport bakterii endofitycznych tkankami przewodzącymi jest ograniczony ze względu na samą budowę tych elementów. Ma to związek z pasmami Kaspariego, które stanowią barierę utrudniającą endofitom przedostanie się przez endodermę. W warunkach naturalnych często jednak dochodzi do uszkodzeń endodermi, które pozwalają na przedostanie się drobnoustrojów do wnętrza tkanek przewodzących. Produkcja enzymów takich jak endoglukanaza [73] czy endopoligalakturonaza [10] wydaje się być niezbędna w procesie rozprzestrzeniania się endofitów. Tkanki przewodzące oraz przestrzenie międzykomórkowe to najczęściej zasiedlane nisze. Hallman i wsp. [26] sugerują, że kolonizacja naczyń przewodzących rośliny jest ograniczona przestrzennie, co jest charakterystyczne dla bakterii endofitycznych i odróżnia je od patogenów roślinnych, które dzielą się znacznie szybciej a w efekcie mogą blokować naczynia.

Obecność bakterii endofitycznych udokumentowana została w korzeniach, łodygach, liściach, nasionach, kwiatach a nawet we wnętrzu galasów [26, 91, 96]. Desouza i wsp. [13] stwierdzili bakterie endofityczne w liściach kukurydzy. Przy użyciu szczepu *Pantoea agglomerans* znakowanego markerem *gfp* (*green fluorescent protein*) obserwowano kolonizację przestrzeni międzykomórkowych tkanek korzenia oraz wnętrza ksylemu łądygi eukaliptusów [17]. Natomiast Rouws i wsp. [78] wykorzystując gen markerowy *GUS* (*beta-glucuronidase*) zaobserwowali kolonizację trzciny cukrowej endofityczną bakterią dizaotrficzną *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Kolonizacja wnętrza komórek roślinnych nie jest tak powszechna jak kolonizacja przestrzeni międzykomórkowych, jednak została już kilkakrotnie udokumentowana dla różnych roślin i różnych drobnoustrojów endofitycznych, między innymi przez Hurek i wsp. [32], James i wsp. [34] czy Quidt-Hallman i wsp. [69]. Bakterie, aby wnikać do wnętrza komórek, indukują częściową degenerację ściany komórkowej gospodarza oraz aktywują zmiany wpływu potasu i wodoru [27].

Zdolność bakterii endofitycznych do podziałów komórkowych we wnętrzu rośliny jest bardziej prawdopodobna niż ciągła ich inwazja do wnętrza, a wielkość populacji tych drobnoustrojów jest skorelowana ze stadium rozwojowym i wiekiem rośliny. Liczebność bakterii endofitycznych jest prawdopodobnie kontrolowana przez roślinę oraz warunki środowiskowe. Czynn-

niki biotyczne i abiotyczne również mają wpływ na to zjawisko [27]. Liczebność bakterii endofitycznych jest największa w korzeniach i adekwatnie maleje w łodygach i liściach. Według Kobayashi i Palumbo [40] naturalna liczebność bakterii endofitycznych dla lucerny, słodkiej kukurydzy, buraka cukrowego, bawełny, ziemniaka i dyni waha się pomiędzy 10^2 – 10^6 jtk \times g⁻¹. Badania Zinniel i wsp. [102] potwierdzają te liczebności (10^3 – 10^7 jtk \times g⁻¹ świeżej masy w 42 dniu po inokulacji). Badania Fisher'a i wsp. [18] nad liczebnością endofitów w łodydze kukurydzy pokazują, iż liczebność mikroorganizmów waha się od 3.5×10^6 jtk \times mg⁻¹ świeżej masy w partiach niższych, przez 4.5×10^4 jtk \times mg⁻¹ świeżej masy w części środkowej po 2×10^2 jtk \times mg⁻¹ świeżej masy w partiach wyższych łodygi. Badania innego zespołu [54] nad występowaniem endofitów w dziesięciodniowych roślinach kukurydzy słodkiej pokazały, iż w łodygach może być obecne od 10^2 jtk \times mg⁻¹ świeżej masy do 10^{10} jtk \times mg⁻¹ świeżej masy.

Aby drobnoustroje endofityczne przetrwały we wnętrzu rośliny, muszą być nieustannie zaopatrywane w składniki pokarmowe. Fakt ten nasuwa pytanie odnośnie związków, które mogą być metabolizowane przez te drobnoustroje jako źródło węgla i energii. Większość badaczy uważa, iż endofity metabolizują składniki soków komórkowych, które wypływają do przestrzeni międzykomórkowych. Wśród nich stwierdzano obecność związków fenolowych, o działaniu bakteriobójczym, w znacznych stężeniach, np. kwas kumarowy, ferulowy, chlorogenowy jak również alkohol koniferylowy [51]. Badania własne autorów nad izolatami bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, wyizolowanymi z tkanek roślin kukurydzy, pokazują, iż, kwasy fenolowe mogą także stanowić źródło węgla i energii dla tych drobnoustrojów [66].

4. Oddziaływania molekularne

Niewiele badań odnosi się do interakcji endofit – roślina na poziomie molekularnym. Najprawdopodobniej zasiedlanie rośliny przez bakterie endofityczne ma wpływ na aktywność metaboliczną gospodarza. W związku z tym aktywność metaboliczna rośliny ma ogromne znaczenie w regulacji tempa kolonizacji przez drobnoustroje endofityczne. Wiadomo, iż wczesne etapy kolonizacji rośliny przez drobnoustroje endofityczne są monitorowane i najprawdopodobniej wzmacniane lub osłabiane przez samego gospodarza [98]. Dowodzą tego badania Vinagre i wsp. [99] nad ekspresją genu *shr5*, kodującego LRR-RLK (*Leucine Rich Repeats – Receptor Like Kinase*), białka zaangażowane w transdukcję sygnału roślinnego w trakcie ustanawiania interakcji roślina – endofit. W przypadku inokulacji

trzciny cukrowej bakteriami diazotroficznymi *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* oraz *Azospirillum brasilense* wystąpiło zahamowanie ekspresji genu *shr5*. Natomiast, gdy trzcina cukrowa była inokulowana bakteriami patogenicznymi z gatunku *Herbaspirillum rubrisubalbicans* odnotowano niewielki spadek ekspresji *shr5*. Badania te dowodzą, iż komórki trzciny cukrowej potrafią rozpoznać i reagować na bakterie korzystne i w inny sposób reagują na drobnoustroje patogenne. Guriao de Carvalho i wsp. [25] wskazali, iż w trakcie wczesnych etapów kolonizacji trzciny cukrowej przez endofityczne diazotroficzne bakterie, w komórkach gospodarza ulegają ekspresji różne, nie do końca poznane geny. Ponadto procesy regulujące, które zachodzą w roślinie w trakcie ustanawiania asocjacji dowodzą, iż gospodarz czynnie w tym uczestniczy. Afzal i wsp. [1] uważają, iż mechanizmy, dzięki którym roślina odbiera bodźce i reaguje na nie, uzależnione są od białek receptorowych. W przypadku trzciny cukrowej i endofitycznych diazotroficznymi bakterii istotną rolę odgrywają białe receptory RLKs (*Receptor Like Kinases*) [98].

Odpowiedź molekularna zachodzi również po stronie drobnoustrojów kolonizujących tkanki roślinne. W bakteriach endofitycznych ekspresji ulegają geny niezbędne do wnिकnięcia i skolonizowania tkanki, następnie te odpowiedzialne za przeżycie bakterii we wnętrzu tkanki roślinnej. W zależności od potrzeby, dochodzi także do ekspresji genów odpowiedzialnych za stymulowanie wzrostu rośliny, hamowanie czynnika patogenego lub produkcję różnych substancji biologicznie czynnych [77]. Dowodzą tego między innymi badania Roncato-Maccari i wsp. [76] nad endofityczną bakterią *Herbaspirillum seropedicae* LR15. Oznakowano geny *nif* (wchodzące w skład kompleksu nitrogenazy odpowiedzialnej na związanie wolnego azotu) wprowadzając kasetę *gusA* – kanamycyna w obrębie genu *nifH* (kodującego reduktazę nitrogenazy). Następnie inokulowano mutanty LR15 do nasion roślin kukurydzy, sorga, ryżu oraz pszenicy i obserwowano ekspresję wyżej wymienionych genów w siewkach roślin. Ekspresję genów *hif* zaobserwowano w korzeniach, łodygach i liściach siewek jak również w komórkach bakteryjnych zlokalizowanych w wydzielinach na powierzchni korzeni [76].

5. Znaczenie bakterii endofitycznych dla rośliny

Odkrycie bakterii endofitycznych w roślinach było fenomenem i sporym wyzwaniem jest zrozumienie znaczenia ich funkcji. Wiadomo, że drobnoustroje mogą mieć pozytywny, negatywny lub obojętny wpływ na rośliny i środowisko. Z praktycznego punktu widzenia jesteśmy zainteresowani możliwością

wykorzystania stymulującego działania bakterii na rośliny. Ryan i wsp. [79] zaproponowali podział bakterii endofitycznych na cztery grupy funkcyjne. Do pierwszej z nich zaliczyli te bakterie, które odpowiadają za stymulację wzrostu i rozwoju roślin poprzez produkcję fitostymulatorów lub zwiększenie przyswajalności substancji odżywczych, w tym wiązanie wolnego azotu. W kolejnej grupie znalazły się te taksony, które produkują antybiotyki, substancje immunosupresyjne czy bioinsektycydy. Trzecia grupa endofitów indukuje odporność systemiczną roślin a ostatnia przyczynia się do polepszenia stanu środowiska naturalnego poprzez unieszkodliwianie toksycznych związków chemicznych takich jak np. fenole, chlorofenole, MTBE, TCE, 2,4-D, TNT czy BETX. Przedstawiciele tej grupy wykazują również zdolności do fitorekultywacji gleby skażonych metalami ciężkimi.

Zdolność drobnoustrojów endofitycznych do wiązania wolnego azotu przyczynia się do zwiększenia puli azotu przyswajalnego przez rośliny. Na drodze biologicznego wiązania rocznie uzyskujemy 175×10^6 ton azotu, z czego aż 30% zostaje związane przez układy niesymbiotyczne [43]. Wśród bakterii diazotroficznycych można wyróżnić przedstawicieli rodzajów *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* czy *Azotobacter* [88]. Zdolność do biologicznego wiązania wolnego azotu sprawia, że drobnoustroje te uznaje się również za stymulatory wzrostu roślin, nazwane PGP (*Plant Growth Promoting*). Badania Rodrigues i wsp. [75] nad wpływem *Azospirillum amazonense* na wzrost, plon oraz wiązanie azotu w ryżu wykazały wzrost akumulacji azotu w dojrzewającym zbożu z 3,5 do 18,5%. Inokulacja tym diazotrofem roślin ryżu wpłynęła również korzystnie na liczbę wiech oraz akumulację suchej masy w ziarnach. Wiele innych eksperymentów również potwierdza stymulujący wzrost i rozwój charakter diazotrofów, co zostało podsumowane m.in. przez Klama [39], Reinhold-Hirek i Hurek [72] oraz Strobel [89]. Warto zwrócić szczególną uwagę na trzcinę cukrową, która na pewnych obszarach Brazylii rośnie od kilkudziesięciu lat bez mineralnego nawożenia azotem. Przeprowadzone doświadczenia wskazują na to, że 50–80% azotu związanego, gromadzonego przez tę roślinę pochodzi z atmosfery. Jest to możliwe dzięki symbiozie trzcinicy cukrowej z diazotroficzną bakterią *G. diazotrophicus* [7]. Należy również dodać, że znaczna część azotu pozostaje w resztkach poźniwnych i wzbogaca glebę.

Wykazano iż, bakterie endofityczne, tak jak i rizo-bakterie, mają zdolność do produkcji hormonów roślinnych. Jednym z najczęściej opisywanych jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), należący do grupy auksyn. Enzymatyczna przemiana tryptofanu, prekursora IAA, jest prostą reakcją chemiczną, zatem zdolność drobnoustrojów do biosyntezy tego związku

nie budzi zdziwienia [65]. Fitohormon ten stymuluje wzrost wydłużeniowy, pobudza podziały komórkowe oraz indukuje tworzenie korzeni bocznych. Typowy efekt oddziaływania IAA zaobserwowali Long i wsp. [48]. Inokulowali oni rośliny psianki czarnej wyizolowanymi endofitami, które wykazywały zdolność produkcji IAA. Wpłynęło to na modyfikacje wzrostu korzeni. Wyizolowane z buraka cukrowego przez Shi i wsp. [85] bakterie endofityczne, również wykazywały zdolność do produkcji IAA. Inokulacja roślin trzema wybranymi izolatami, wykazującymi największą zdolności do produkcji IAA, wyraźnie podniosła zawartość świeżej i suchej masy roślin oraz liczbą liści na roślinę. Część drobnoustrojów endofitycznych wykazuje zdolność do produkcji kwasu indolilo-3-masłowego (IBA) zamiast IAA. Został on stwierdzono w pozakomórkowych wydzielinach między innymi u *A. brasiliense* UAP 154 [52].

Niektóre bakterie endofityczne wykazują zdolność do modyfikacji poziomu etylenu w roślinie. Etylen hamuje wzrost wydłużeniowy oraz przyspiesza procesy dojrzewania i starzenia się tkanek. Kontrola ilości etylenu w tkankach roślinnych poprzez drobnoustroje polega na syntezie enzymu deaminazy ACC (deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyloego), który rozszczepia ACC, prekursor etylenu, do amoniaku i kwasy ketomasłowego [23]. Badania Long'a i wsp. [48] wykazały pozytywną korelację pomiędzy aktywnością bakteryjnej deaminazy ACC a wzrostem korzeni psianki czarnej, im większa aktywność bakteryjnej deaminazy ACC, tym korzenie rośliny były dłuższe. Badacze stwierdzili również spadek ilości etylenu wydzielanego przez siewki w miarę wzrostu aktywności deaminazy ACC. Niektóre drobnoustroje, tj. *Pseudomonas putida* WU4 czy *A. brasiliense* Cd1843, dzięki zdolności do modyfikacji poziomu etylenu poprzez syntezę deaminaz ACC, wydają się być obiecującymi czynnikami biologicznej kontroli patogennych szczepów *Rhizobium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) oraz *Rhizobium vitis* (*Agrobacterium vitis*) infekujących rośliny pomidora [94].

Drobnoustroje endofityczne brane są również pod uwagę jako istotny element biologicznej ochrony roślin. Przejawia się ona w dwojaki sposób. Pierwszy z nich to antagonistyczne zachowania względem patogenów, polegające np. na produkcji związków biologicznie czynnych. Oddziałują na pojedyncze czynniki chorobotwórcze i wywołują jednorazowy skutek. Drugi sposób ochrony biologicznej to indukcja odporności systemicznej (ISR – *Induction of Systemic Resistance*). Zjawisko to opiera się na wykorzystaniu mechanizmów obronnych rośliny, które są jedynie uaktywniane przez drobnoustroje endofityczne [39].

Wiele gatunków bakterii endofitycznych wykazuje antagonistycznie działanie przeciwko patogenom

roślinnym. Przykładem może być endofityczny *Bacillus subtilis* czy *P. fluorescens*, które wykazywały antagonisticzne działanie przeciwko grzybom z gatunku *Fusarium oxysporum* powodującym zgniliznę orzeszków ziemnych [101]. *P. fluorescens*, wyizolowany z bakłazanu wykazywał antagonisticzne działanie w stosunku do bakterii z gatunku *Ralstonia solanacearum* [71]. Również izolaty endofityczne z innych gatunków z rodziny psiankowatych wykazywały antagonizm w testach *in vitro* przeciwko 9 patogenom, w tym przeciw *R. tumefaciens* [47].

Coraz częściej można spotkać się z zastosowaniem endofitów bakteryjnych w procesie rekultywacji gleb. Fitorekultywacja wykorzystuje rośliny w celu detoksykacji ksenobiotycznych związków lub w celu ich fitoekstrakcji, w szczególności w przypadku metali ciężkich. Obywa się to poprzez ich akumulację i usunięcie wraz z biomasa roślin z danego środowiska. Rośliny, które są zdolne do akumulowania niezwykle wysokich ilości metali ciężkich bez żadnego wpływu na swój wzrost i rozwój zostały nazwane hyperakumulatorami. Należą do nich rośliny z rodzajów *Thlaspi*, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum* czy *Alyssum* [3, 19]. Drobnoustroje izolowane z zanieczyszczonych środowisk wykazują większą tolerancję na metale ciężkie a możliwości endofitów jako potencjalnych organizmów redukujących ich zawartość w środowisku jest nieustannie badane. Bakterie endofityczne z gatunku *Methylobacterium populi* BJ001 wyizolowane z tkanek topoli wykazała zdolność do degradowania nitrowanych węglowodorów aromatycznych [95]. Badania Bara' a i wsp. [4] nad bakteriami *Burkholderia cepacia* G4 wyizolowanymi z żółtego łubinu pokazały, iż inokulacja roślin łubinu żółtego tym szczepem spowodowała wzrost tolerancji rośliny na toluen. Rośliny grochu zwyczajnego szczepione izolatami bakterii endofitycznej *P. putida*, zdolnymi do degradowania kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego, nie wykazały akumulacji tego herbicydu w tkankach w porównaniu do roślin niezasiadlonych bakteriami, które wykazywały objawy zatrucia [22]. Natomiast szczepy bakterii endofitycznych, *Sanguibacter* sp. oraz *Pseudomonas* sp., wyizolowanych z nasion tytoniu wykazały zdolność do ograniczenia toksyczności kadmu na rośliny tytoniu poprzez zwiększenie przyswajalności cynku i żelaza [53]. Madhaya i wsp. [50] stwierdzili, że bakterie endofityczne *Methylobacterium oryzae* oraz *Burkholderia* sp., wyizolowane z tkanek ryżu, zredukowały toksyczny wpływ kadmu i niklu na nasiona pomidora w warunkach *in vitro*.

Zmiana dostępności i toksyczności metali pod wpływem przemian metabolicznych indukowanych przez bakterie endofityczne wynika ze zmian odczynu pH (produkcja kwasów organicznych), kompleksowania jonów metali z udziałem sideroforów jak i tworzenia nierozpuszczalnych soli kwasów organicznych [80, 84].

6. Endofity jako potencjalne patogeny i inhibitory wzrostu roślin

Powiązania pomiędzy gospodarzem a endofitem mają charakter symbiozy mutualistycznej lub komensalizmu. Jednak, niektóre grzyby endofityczne, w zależności od stadium rozwojowego grzyba, fazy życia rośliny, czynników środowiskowych oraz odpowiedzi gospodarza, mogą stać się patogenami [82]. Czy ten fakt może również dotyczyć endofitów bakteryjnych? Jak do tej pory, niewielka ilość danych nie pozwala odpowiedzieć na to pytanie. Rose n b l u e t h i M a r t i n e z - R o m e r o [77] sugerują, że niektóre bakterie endofityczne mogą stać się inhibitorami wzrostu rośliny pod wpływem określonych warunków, takich jak akumulacja CO₂, zmniejszenie dostępności O₂ lub w momencie interakcji z innym mikroorganizmem. Są również dane wskazujące, że bakteria, która dla danego gatunku jest endofitem, dla niektórych odmian tego gatunku może być patogenem. Przykładem są bakterie z gatunku *H. rubrisubalbicans*, które tylko w przypadku niektórych odmian trzciny cukrowej powodują plamistość liści WMSD (*mild mottled stripe disease*) [61]. Innym przykładem na wybiórczość drobnoustrojów oraz gospodarzy mogą być niektóre szczepy z rodzaju *Pseudomonas*, izolowane ze zdrowych tkanek roślin pomidora, które w momencie reinokulacji do siewek pomidora hamowały ich wzrost [97]. Również badania M o n t a n e z a i wsp. [58] nad 22 szczepami zdolnymi do wiązania N₂, pozyskanymi z tkanek różnych odmian kukurydzy, wykazały iż w selektywny sposób szczepy te promowały lub hamowały przyrost biomasy lub długość korzenia zarodkowego.

Innym nasuwającym się pytaniem jest, czy endofity bakteryjne mogą stanowić źródło zagrożenia dla człowieka? W niektórych przypadkach, bakterie endofityczne izolowane z tkanek zdrowych roślin są blisko spokrewnione z ludzkimi patogenami. Wątpliwości wzbudza m.in. *B. cepacia* będąca przyczyną zakażeń oportunistycznych [46], która została stwierdzona wśród endofitów trzciny cukrowej [56] czy kukurydzy [55], jak również *Staphylococcus* spp. stwierdzony w korzeniu marchwi zwyczajnej [93] lub owocach jabłoni [64]. Uwagę naukowców przyciągają także *Salmonella* spp. oraz *E. coli* O157:H7 ze względu na liczne w ostatnich czasach zatrucia pokarmowe [81]. Badania K u t t e r i wsp. [44] nad kolonizacją roślin jęczmienia przez szczepy *S. enterica* serotyp Typhimurium wykazały ich zdolność do kolonizacji ryzodermy oraz kory korzenia. K r o u p i t s k i i wsp. [42] sugerują, iż w przypadku endofitycznej kolonizacji liści sałaty lodowej przez *S. enterica* serotyp Typhimurium istotnymi czynnikami są światło oraz zdolność szczepu do chemotaksji. Badania tego zespołu sugerują, iż składniki odżywcze produkowane *de novo* w komórkach

aktywnych fotosyntetycznie stanowią chemoatraktant dla tego patogenu [42]. Ponadto, badania Barak i wsp. [5] dowodzą, że również geny wirulencji, m.in. gen *agfB* (kodujący fragment fimbrii), są niezbędne do kolonizacji tkanek roślinnych przez *S. enterica*. Shironi Yaron [86] wykazali, iż żywe komórki *S. enterica* serotyp Typhimurium w aktywny sposób wyciszają system odpornościowy roślin tytoniu w trakcie kolonizacji, natomiast komórki martwe lub traktowane chloramfenikolem powodują m.in. uwolnienie reaktywnych form tlenu ROS (*Reactive Oxygen Species*) i zmianę pH w komórkach. Ponadto, delecja w genie *invA* (kodującego jedno z białek rdzenia aparatu sekrecyjnego typu III; T3SS) redukuje zdolność *S. enterica* do supresji systemu odpornościowego, co sugeruje istotną rolę T3SS w kolonizacji tkanek roślin tytoniu [86]. Również szczep *E. coli* O157:H7 zdolny jest do kolonizacji wnętrza tkanek roślinnych [87], tym samym stając się odpornym na środki dezynfekujące stosowane powierzchniowo m.in. w produkcji warzyw liściastych. W niektórych przypadkach oportunistyczne patogeny w bardziej efektywny sposób kolonizują strefę korzenia niż izolaty rizosferowe o właściwościach PGP. Badania Egamberdiewa [15] wykazały, iż szczep *P. aeruginosa* TSAU125 nie tylko lepiej kolonizował korzenie pomidora w porównaniu z izolatem referencyjnym *P. fluorescens* PCL1285, ale także stymulował wzrost pędów inokulowanych roślin.

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) sugeruje, aby w biologicznej ochronie roślin wykorzystywać drobnoustroje, których maksymalna temperatura wzrostu nie przekracza 35°C. Hallmann i Berg [28] sugerują, iż niektóre bakterie patogeniczne różnią się od bakterii endofitycznych, zasiedlających tkanki roślinne, ekspresją określonych toksyn. Jeżeli nawet niektóre szczepy bakterii endofitycznych różnią się od szczepów patogennych, to ich bliskie pokrewieństwo może sprawić, że poprzez horyzontalny transfer genów może dojść do nabycia genów zjadliwości od krewniaczych patogenów [77].

7. Podsumowanie

W okresie ostatnich dwudziestu lat w literaturze przedmiotu odnotowujemy narastające zainteresowanie bakteriami endofitycznymi, które zasiedlają tkanki zdrowych roślin zielnych [70], t.j. roślin strączkowych [20], bawełny [54], bulw ziemniaka lub całych roślin [21, 47, 91], owoców pomidora [60], pszenicy [12, 45], soi [31] jak również drzew m.in. dębu [8] czy gruszy [100]. Istnieje duże zróżnicowanie gatunków roślin, które są zasiedlane przez drobnoustroje, ale również różnorodność ta dotyczy taksonów bakterii koloni-

zujących rośliny. Od momentu kiełkowania nasion aż do osiągnięcia przez roślinę pełnej dojrzałości drobnoustroje rozwijają się w komórkach i przestrzeniach międzykomórkowych gospodarza w ścisłej współzależności [49]. Powiązania pomiędzy roślinami a endofitami są, zatem zjawiskiem powszechnym, przynoszącym korzyści obu stronom [39]. Drobnoustroje stanowią potencjalne źródło biologicznych środków służących zwalczaniu szkodników i chorób roślin. Coraz większe zainteresowanie tymi drobnoustrojami zmierza w kierunku wykorzystania ich w biologicznej ochronie roślin. Zastosowanie preparatów na bazie takich drobnoustrojów wydaje się być alternatywą dla środków chemicznych w zrównoważonym rolnictwie. Może to przynieść rolnictwu wiele korzyści, w tym zwiększyć efektywność nawożenia mineralnego, zmniejszyć koszty produkcji rolniczej w wyniku racjonalnego wykorzystania nawozów jak również zmniejszyć zużycie chemicznych środków ochrony poprawiając tym samym kondycję środowiska naturalnego. Duże zainteresowanie bakteriami endofitycznymi jako potencjalnym źródłem mikroorganizmów wykorzystywanych w ochronie biologicznej wymusza potrzebę rzetelnie przeprowadzonej analizy gatunkowej a także oceny wpływu na roślinę – gospodarza. Aby w biologicznej ochronie roślin uniknąć wykorzystania potencjalnych ludzkich patogenów, mikroorganizmy muszą zostać poddane kompleksowej ocenie ryzyka. W krajach Unii Europejskiej ocena ta opiera się na zasadach, które zostały pierwotnie opracowane dla syntetycznych pestycydów. Pomimo tego, że dyrektywa EU dotycząca rejestracji drobnoustrojów jako BCAs (*Biological Control Agents*), została dostosowana do lepszego poznania wymagań drobnoustrojów, to proces rejestracji biopreparatów nadal jest czasochłonny i wymaga dużych nakładów finansowych. W krajach UE rejestracja BCAs trwa aż 7 lat, co zniechęca do komercjalizacji tego typu badań i jednocześnie ogranicza wprowadzenie na rynek bezpieczniejszych środków ochrony roślin.

Piśmiennictwo

1. Afzal A.J., Wood A.J., Lightfoot D.A.: Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 5, 507–517 (2008)
2. Bacilio-Jimenez M., Aguilar-Flores S., Ventura-Zapata E., Perez-Campos E., Bouquelet S., Zenteno E.: Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic responses of endophytic bacteria. *Plant. Soil*, 249, 271–277 (2003)
3. Baker A.J.M., Brooks R.R.: Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81–126 (1989)
4. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., Van Der Lelie D.: Engineered end-

- phytic bacteria improved phyto-remediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.* **22**, 583–588 (2004)
5. Barak J.D., Gorski L., Naragi-Arani P., Charkowski A.O.: Salmonella enterica genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5685–5691 (2005)
 6. Benhamout N., Belanger R.R., Paulitz T.: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between *Pseudomonas fluorescens* and Ri T-DNA transformed pea roots: host response to colonization by *Pythium ultimum* Trow. *Planta*, **199**, 105–117 (1996)
 7. Błaszczuk M.K.: Mikrobiologia środowisk, Wyd. PWN, Warszawa 2010, str. 81–85
 8. Brooks D.S., Gonzalez C.F., Appel D.N., Filer T.H.: Evaluation of endophytic bacteria as potential biocontrol agents for oak wilt. *Biol. Control*. **4**, 373–381 (1994)
 9. Cankar K., Kraigher H., Ravnikar M., Rupnig M.: Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Krast). *FEMS Microbiol. Lett.* **244**, 341–345 (2005)
 10. Compant S.: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia sp.* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1685–1693 (2005)
 11. Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clement Ch., Ait Barka E.: Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**, 84–93 (2008)
 12. Coombs J.T., Franco C.M.M.: Isolation and identification of actinobacteria isolated from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5303–5308 (2003)
 13. De Souza A.O., Pamphile A., De Mello Sartori C.L., Da Rocha C., Azevedo J.L.: Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by scanning electron microscopy. *Acta Scientiarum, Biol. Sci.* **26**, 357–359 (2004)
 14. Dong Z., Canny M.J., McCully M.E., Roborendo M.R., Cabadilla C.F., Ortega E., Rodes R.: A nitrogen fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant. Physiol.* **105**, 1139–1147 (1994)
 15. Egamberdieva D.: Colonization of tomato roots by some potentially human-pathogenic bacteria and their plant-beneficial properties. *Eur. Asia J. BioSci.* **4**, 112–118 (2010)
 16. Elbeltagy A., Nishioka K., Suzuki H., Sato T., Sato Y., Morisaki H., Mitsui H., Minamisawa K.: Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* **46**, 617–629 (2000)
 17. Ferreira A., Quecine M.C., Lacava P.T., Oda S., Azevedo J.L., Araujo W.L.: Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **287**, 8–14 (2008)
 18. Fisher P.J., Retrini O., Scott H.M.L.: The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytol.* **122**, 299–305 (1992)
 19. Freitas H., Prasad M.N.V., Pratas J.: Analysis of serpentinophytes from north-east of Portugal for trace metal accumulation relevance to the management of mine environment. *Chemosphere*, **54**, 1625–1642 (2004)
 20. Gagne S., Richard C., Lousseau H., Btoun H.: Xylem residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* **33**, 996–1000 (1987)
 21. Garbeva P., Van Overbeek L.S., Van Vuurde J.W.L., Van Elsas J.D.: Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.* **41**, 369–383 (2001)
 22. Germaine K., Liu X., Cabellos G., Hogan J., Ryan D., Dowling D.N.: Bacterial endophyte-enhanced phyto-remediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**, 302–310 (2006)
 23. Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J.: Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* **26**, 227–242 (2007)
 24. Gottlieb M.: Czynniki determinujące zdolność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* do kolonizacji systemu korzeniowego roślin. *Post. Mikrobiol.* **41**, 277–297 (2002)
 25. Gurjao de Carvalho T.L., Ferreira P.C.G., Hemery A.S.: Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. *Tropical Plant Biol.* **4**, 31–41 (2011)
 26. Hallmann J., Quadt-Hallman A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W.: Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**, 895–914 (1997)
 27. Hallmann J.: Plant interactions with endophytic bacteria (w) Biotic interactions in plant-pathogen association, red. Jeger M.J., Spence N.J. CAB International 2001, str. 87–119
 28. Hallmann J., Berg G.: Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes (w) Microbial root endophytes, red. Schulz B., Boyle C., Sieber T., Spinger – Verlag, Berlin 2006, str. 26–27
 29. Haridoim P.R., Van Ovebeek L.S., Van Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
 30. Holliday P.: A Dictionary of Plant Pathology, Cambridge University Press, Cambridge 1989
 31. Hung P.Q., Annapurna K.: Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine sp.*). *Omornice*, **12**, 92–101 (2004)
 32. Hurek T., Reinhold-Hurek B., Van Montagu M., Kellenberger E.: Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus sp.* strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* **176**, 1913–1923 (1994)
 33. James D.W., Suslow T.V., Steinback K.E.: Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 392–397 (1985)
 34. James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldini J.L., Dobereiner J.: Infection of sugarcane by the nitrogenfixing bacterium *Acetobacter diazotrophus*. *J. Exp. Bot.* **45**, 757–766 (1994)
 35. James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio W.L., Reddy P.M., Iannetta P.P., Olivares F.L., Ladha J.K.: Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 894–906 (2002)
 36. Kado C. I.: Plant pathogenic bacteria. In: The Prokaryotes, edited by Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H., Springer-Verlag, New York 1992, str. 660–662
 37. Kaga H., Mano H., Tanaka F., Watanabe A., Kaneko S., Morisaki H.: Rice seeds as a sources of endophytic bacteria. *Microbes Environ.* **24**, 154–162 (2009)
 38. Khammas K.M., Kaiser P.: Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant. Soil.* **137**, 75–79 (1992)
 39. Klama J.: Współzycie endofitów bakteryjnych z roślinami (artykuł przeglądowy). *Acta Scient. Polon.* **31**, 19–28 (2004)
 40. Kobayashi D.Y., Palumbo J.D.: Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture (w) Microbial Endophytes., red. Bacon C.W., White J.F., Marcel Dekker, Inc., New York 2000, str. 199–233
 41. Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D., Kozyrovska N.: Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil*, **215**, 1–6 (1999)
 42. Kroupitski Y., Golberg D., Belausov E., Pinto R.S., Wartzberg D., Granot D., Sela S.: Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6076–6086 (2009)

43. Król M.J., Zielewicz-Dukowska J.: Genetyczne aspekty wiązania N₂ bakterii z rodzaju *Azospirillum*. *Post. Mikrobiol.* **44**, 47–56 (2005)
44. Kutter S., Hartmann A., Schmid M.: Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**, 262–271 (2006)
45. Larran S., Perello A., Simon M.R., Moreno V.: Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 683–686 (2002)
46. LiPuma J.J.: *Burkholderia cepacia* complex as human pathogen. *J. Nematology.* **35**, 212–217 (2003)
47. Long H.H., Furuya N., Kurose D., Tekashita M., Takanami Y.: Isolation of endophytic bacteria from *Solanum* sp. and their antibacterial activity against plant pathogenic bacteria. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **48**, 21–28 (2003)
48. Long H.H., Schmidt D.D., Baldwin I.T.: Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner, phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS ONE*, **3**, e2702 (2008)
49. Lynch J.M.: *Soil Biotechnology: Microbiological Factors in Crop Productivity*, Blackwell Sci. Publ. Ltd., Oxford 1983
50. Madhaiyan M., Poonguzhali S.: Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere*, **69**, 220–228 (2007)
51. Maksimovic, J.D., Maksimovic, V., Zivanovic, B., Sukalovic, V.H.T., Vuletic, M.: Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant Science*, **175**, 656–662 (2008)
52. Martinez-Morales L.J., Soto-Urzuza L., Baca B.E., Schanchez-Ahedo A.: Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 167–173 (2003)
53. Mastretta Ch., Taghavi S., Van Der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli Ch., Barac T., Boulet J., Weyens N., Vangronsveld J.: Endophytic bacterium from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediation*, **11**, 251–267 (2009)
54. McInroy J.A., Kloepper J.W.: Population dynamic of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Can. J. Microbiol.* **41**, 895–901 (1995)
55. McInroy J.A., Kloepper J.W.: Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil*, **173**, 337–342 (1995)
56. Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araujo W.L., Raaijmakers J.M.: Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7259–7267 (2007)
57. Michiels K.W., Croes C.L., Vanderleyden J.: Two different models of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2241–2246 (1991)
58. Montaneza A., Blanco A.R., Barlocco C., Beracochea M., Sicardi M.: Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. *Appl. Soil Ecol.* **58**, 21–28 (2012)
59. Mundt J.O., Hinkle N.F.: Bacterial within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 694–698 (1976)
60. Nejad P., Johnson P.A.: Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biol. Control.* **18**, 208–215 (2000)
61. Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.L., Dobereiner J.: Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. *Biol. Fertil. Soil.* **21**, 197–200 (1996)
62. Oksińska M.P., Wright S.A.I., Pietr S.J.: Colonization of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) by strains of *Pseudomonas* spp. with respect to their nutrient utilization profiles. *Eur. J. Soil Biol.* **47**, 356–373 (2011)
63. Peterson C.A., Emanuel M.E., Humphreys G.B.: Pathways of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn and broad bean. *Can. J. Bot.* **59**, 618–625 (1981)
64. Phukon M., Sahu P., Srinath R., Nithya A., Babu S.: Unusual occurrence of *Staphylococcus warneri* as endophyte in fresh fruits along with usual *Bacillus* spp. *J. Food Safety*, **33**, 102–106 (2013)
65. Pietr S.: Wpływ saprofitycznej mikroflory ryzozsfer na wzrost roślin. *Post. Nauk Rol.* **3**, 19–38 (1990)
66. Pisarska K.: Analiza zróżnicowania bakterii endofitycznych zasiedlających różne odmiany kukurydzy (*Zea mays* L.), Rozprawa doktorska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu (2013)
67. Prieto P., Schiliro E., Mercedes Maldonado-Gonzalez M., Valderrama R., Bautista Barroso-Albarracin J., Mercado-Blanco J.: Root hairs play a key role in the endophytic colonization on olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microb. Ecol.* **62**, 435–445 (2011)
68. Quadt-Hallmann A., Hallmann J., Kloepper J.W.: Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can. J. Microbiol.* **43**, 254–259 (1997)
69. Quadt-Hallmann A., Benhamou N., Kloepper J.W.: Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Can. J. Microbiol.* **43**, 577–582 (1997b)
70. Rai R., Dash P.K., Prasanna B.M.: Endophytic bacterial flora in the stem tissue of tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 853–858 (2007)
71. Ramesh R., Joshi A.A., Ghanekar M.P.: *Pseudomonas*: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 47–55 (2009)
72. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* **6**, 139–144 (1998)
73. 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. strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 181–188 (2006)
74. Reuhs B.L., Relic B., Forsberg L.S., Marie C., Ojanen-Reuhs T., Stephens S.B., Wong C.H., Jabbouri S., Broughton W.J.: Structural characterization of flavonoid-inducible *Pseudomonas aeruginosa* a-band-like O antigen of *Rhizobium* sp. strain NGR234, required for the formation of nitrogen-fixing nodules. *J. Bacteriol.* **187**, 6479–6487 (2005)
75. Rodrigues E.P., Rodrigues L.S., Martinez de Oliveira A.L., Baldani V.L.D., Dos Santos Teixeira K.R., Urquiaga S., Reis V.M.: *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, **302**, 249–261 (2008)
76. Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M.B.R., Souza E.M.: Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* express nif genes in gramineous plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* **45**, 39–47 (2003)
77. Rosenbleuth M., Martinez-Romero E.: Bacterial endophytes and their interaction with host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 827–837 (2006)
78. Rouws L.F.M., Meneses C.H.S.G., Guedes H.V., Vadil M.S., Baldani J.L., Schwab S.: Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reported genes. *Lett. Appl. Microbiol.* **5**, 325–330 (2010)

79. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N.: Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 1–9 (2008)
80. Saravanan V.S., Madhaiyan M., Thangaraju M.: Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, **66**, 1794–1798 (2007)
81. Schikora A., Garcia A.V., Hirt H.: Plants as alternative hosts for *Salmonella*. *Trends Plant Sci.* **17**, 245–249 (2012)
82. Schulz B., Boyle C.: The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **109**, 661–686 (2005)
83. Shawn L.J., Morris P., Hooker J.E.: Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* **8**, 1867–1880 (2006)
84. Sheng X.F., Xia J.J., Jiang C.Y., He L.Y., Qian M.: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* **156**, 1164–1170 (2008)
85. Shi Y., Lou K., Li Ch.: Promoting of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol. Fertil. Soil.* **45**, 645–653 (2009)
86. Shirron M., Yaron S.: Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *PLoS ONE*, **6**, e18855 (2011)
87. Solomon E.B., Yaron S., Matthews K.R.: Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 397–400 (2002)
88. 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)
89. Strobel G.A.: Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect.* **5**, 535–544 (2003)
90. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J.: Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257–268 (2004)
91. Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G., Arsenault W.J., Buchanan N.A.: Endophytic bacteria communities in the periderma of potato tubers and their potential to improve resistance to soil borne plant pathogens. *Plant Pathol.* **48**, 360–369 (1999)
92. Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G., Nowak J.: Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soil.* **25**, 13–19 (1997)
93. Surette M.A., Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J.: Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *Sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil*, **253**, 381–390 (2003)
94. Toklikishvili N., Dandurishvili N., Vainstein A., Tediashvili M., Giorgobiani N., Lurie S., Szegedi E., Glick B.R., Chernin L.: Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis*. *Plant Pathol.* **59**, 1023–1030 (2010)
95. Van Aken B., Yoon J.M., Schnoor J.L.: Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides nigra* DN34). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 508–517 (2004)
96. Van Oevelen S., De Wachter R., Vandamme P., Robbrecht E., Prinsen E.: Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of „*Candidatus burkholderia kirkii*” sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 2023–2027 (2002)
97. Van Peer R., Punte H.L.M., De Weger L.A., Schippers B.: Characterization of root surface and endorhizosphere *Pseudomonas* in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2462–2470 (1990)
98. Vargas C., De Padua V.L.M., Nogueira E.M., Vinagre F., Masuda H.P., Da Silva F.R., Baldani J.I., Ferreira P.C.G., Hemeryly A.: Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis*, **35**, 159–180 (2003)
99. Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C., Hemeryly A.S.: SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J. Exp. Botany*, **57**, 559–569 (2006)
100. Whitesides S.K., Spotts R.A.: Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathol.* **81**, 453–457 (1991)
101. Ziedan E.H.E.: Manipulating endophytic bacteria of biological control to soil-borne diseases of peanut. *J. Appl. Sci. Res.* **2**, 497–502 (2006)
102. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G., Vidavera A.K.: Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2198–2208 (2002)

Artykuł powstał w wyniku realizacji pracy doktorskiej częściowo finansowanej przez NCN 2011/01/N/NZ9/02332.

